

**Caracterização de biofilmes de
estirpes persistentes de *Listeria monocytogenes***

Ana Isabel Dias Gonçalves

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientadores: Professora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

Doutora Paula Cristina Branco Cabrita Cunha

Júri:

Presidente: Doutora Fernanda Maria dos Reis Torroaes Valente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Esta dissertação respeita a ortografia anterior ao actual acordo ortográfico.

Aos meus pais. Todo o vosso trabalho e esforço nunca foi em vão.

Agradecimentos

Realizar um trabalho deste género exige imenso de nós e dos que estão dentro do projecto. O apoio das pessoas da nossa vida é fundamental, por isso quero agradecer, do fundo do meu coração, a todos aqueles que fizeram parte desta etapa da minha vida.

Agradeço à Professora Doutora **Luísa Brito** por aceitar ser minha orientadora. Um grande obrigado pela preocupação, carinho, paciência, apoio, disponibilidade, orientação, por todos os conhecimentos que me transmitiu e por toda a boa disposição mostrada todos os dias.

À Doutora **Paula Cabrita**, por também ter aceite ser minha orientadora. Muito obrigada por tudo, principalmente pelo apoio, preocupação e por toda a paciência que teve comigo, pela disponibilidade em ajudar sempre que necessitei e por todos os conhecimentos que também me transmitiu.

À Mestre **Ana Carla Silva** pela força, boa disposição, disponibilidade em ajudar e por todos os conhecimentos adquiridos ao longo do trabalho.

À D. **Lena** e à D. **Manuela** por toda a ajuda que me foi dada durante a elaboração experimental, pela amizade, carinho e principalmente por toda a alegria e animação que me deram todos os dias.

Ao **Tomás Miranda** por toda a ajuda, companhia, amizade, alegria e divertimento. Muito obrigada pela animação.

À **Beatriz Cardoso**. Foste das melhores pessoas que conheci e a melhor companheira de laboratório que eu podia ter pedido. Um enorme obrigado pela ajuda, pelas gargalhadas, conversas e, principalmente, pela amizade.

À **Sofia Nunes**. És a minha companheira de “luta”, desde o primeiro dia de faculdade. Lembraste-me sempre de quem realmente sou e do que sou capaz de conquistar. Estives-te sempre presente, aturás-te os meus dramas, os meus desabafos e as minhas parvoíces. Os dias difíceis contigo tornaram-se mais suportáveis e com mais alegria. Obrigada por TUDO.

À **Vera Maia** e à **Inês Barroso** por toda a alegria e animação sempre que estamos juntas. Obrigada por toda a ajuda, apoio, companhia, preocupação e amizade.

À **Ana Rita Tomás** pelos dois anos de vida académica com muita amizade, alegria, apoio e diversão. Em pouco tempo mostraste ser um exemplo para mim e tornaste-me uma pessoa melhor. Obrigada por fazeres parte da minha vida.

À minha Rutinha (**Rute Santos**) por todo o apoio, paciência, motivação e pela amiga verdadeira que sempre mostraste ser. Obrigada por seres uma pessoa maravilhosa, por me relembrares das minhas capacidades e por tornares a minha vida mais “rica”.

À minha Ritinha (**Rita Tavares**). Obrigada pelos mais de doze anos de amizade, gargalhadas e boa disposição. A tua personalidade e a tua alegria tornam os meus dias mais felizes.

Ao meu **grupo de amigos**, pelos bons momentos passados, pelas gargalhadas, pelo incentivo e pelo apoio durante esta fase a minha vida.

Ao meu namorado **Carlos Tavares**. Palavras não conseguem descrever tudo o que fizeste por mim, toda a motivação e apoio. Mostraste-me que desistir era apenas a escolha mais fácil e que lutar era a única opção. Relembraste-me sempre daquilo que valho e do que sou capaz. Obrigada por acreditares em mim.

Por último e com a maior das importâncias, aos meus **pais**. São o maior exemplo de luta, coragem e trabalho que alguém pode ter. É impossível descrever em palavras o imenso orgulho que tenho por vocês. Obrigada por me proporcionarem a vida que tenho e todo o investimento feito na minha vida académica.

Resumo

Algumas estirpes de *L. monocytogenes* têm a capacidade de formar biofilmes e persistir em ambientes industriais, por longos períodos de tempo, mesmo após os processos de higienização. O principal objectivo deste trabalho foi caracterizar estirpes persistentes, em indústrias de carne de suíno e de aves, relativamente à sua capacidade de formação de biofilme e à susceptibilidade a um desinfectante comercial (P3 OXONIA) baseado em peróxido de hidrogénio, ácido acético e ácido peracético.

A capacidade de formação de biofilme foi avaliada através do método do cristal violeta e pela enumeração de células viáveis em *coupons* de aço inoxidável. As temperaturas de incubação foram de 25 °C e de 11 °C, durante 48 h e 7 dias, respectivamente. De modo a simular diferentes eficiências de higienização dos equipamentos, a formação de biofilme em aço inoxidável foi avaliada em meio de cultura TSB-YE e em meio diluído (TSB-YE/10).

Em geral, com ambos os métodos, as estirpes apresentaram menor formação de biofilmes a 11 °C do que 25 °C. Foi também observada uma menor formação de biofilme para incubações em meio diluído, em ambas as temperaturas. Quando o desinfectante foi aplicado (1% (v/v), 7,5 minutos) a biofilmes produzidos a 11 °C em TSB-YE/10, em geral, as estirpes mostraram menor susceptibilidade. Não se verificou, no entanto, relação entre a capacidade de formação de biofilme e a susceptibilidade ao P3 OXONIA.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, biofilme, persistência, susceptibilidade ao P3 OXONIA

Abstract

Some strains of *L. monocytogenes* have the ability to form biofilms and to persist in industrial environments for long periods of time, even after sanitizing procedures. The main objective of this work was to characterize persistent strains from the pork and poultry industries regarding their biofilm forming ability and the susceptibility to a commercial disinfectant (P3 OXONIA) based on hydrogen peroxide, acetic and peracetic acid.

The biofilm forming ability was evaluated by the crystal violet method and by the enumeration of viable cells in stainless steel coupons, respectively. Incubation temperatures were 25 °C and 11 °C, for 48 h and 7 days, respectively. In order to simulate different equipment hygienization efficiencies, the biofilm formation was evaluated in stainless steel coupons in TSB-YE culture medium and in diluted medium (TSB-YE/10).

In general, with both methods, the strains showed lower biofilm formation at 11 °C than at 25 °C. A lower biofilm formation was also observed in diluted medium, at both temperatures. When the disinfectant was applied (1% (v/v), 7.5 minutes) to biofilms produced at 11 °C in TSB-YE/10, the strains generally showed less susceptibility. There was, however, no relationship between the biofilm forming ability and the susceptibility of the strains to P3 OXONIA.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, biofilm, persistence, susceptibility

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	IV
Índice de figuras e quadros	VII
1. Introdução	1
1.1. Caracterização geral de <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2. Listeriose e patogenicidade	3
1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> na indústria alimentar	7
1.4. Biofilmes bacterianos	7
1.5. Susceptibilidade a antimicrobianos	9
1.6. Persistência	12
1.7. Estudo da capacidade de formação de biofilmes	13
1.8. Objectivos do trabalho	14
2. Material e métodos	15
2.1. Estirpes utilizadas	15
2.2. Meios de cultura	15
2.3. Soluções	16
2.4. Condições de crescimento das estirpes bacterianas	18
2.5. Ensaio prévios	18
2.5.1. Confirmação das estirpes	18
2.5.2. Serotipagem molecular: Multiplex PCR	18
2.6. Formação de biofilmes e resposta aos agentes desinfectantes	21
2.6.1. Método do cristal violeta (CV)	22
2.6.2. Enumeração celular (EC) em <i>coupons</i> de aço inoxidável	23
2.6.3. Avaliação da susceptibilidade, do biofilme, ao P3 OXONIA através de redução logarítmica	25
2.7. Análise de dados	26

3.	Resultados e Discussão	27
3.1.	Serotipagem molecular: Multiplex PCR	27
3.2.	Avaliação da formação de biofilme	27
3.2.1.	Método do cristal violeta	28
3.2.2.	Enumeração celular	30
3.3.	Avaliação da susceptibilidade ao P3 OXONIA	36
3.3.1.	Susceptibilidade de biofilmes produzidos a 25 °C	36
3.3.2.	Susceptibilidade de biofilmes produzidos a 11 °C	40
4.	Conclusões e perspectivas futuras	47
5.	Bibliografia	49

Índice de figuras e quadros

Figura 1. Representação esquemática da fisiopatologia de uma infecção por <i>Listeria</i> .	5
Figura 2. Invasão intracelular por <i>Listeria monocytogenes</i> .	6
Figura 3. Representação do processo de formação e crescimento de biofilmes.	9
Figura 4. Disposição das estirpes nas microplacas P96.	22
Figura 5. Disposição das estirpes nas microplacas P24 para produção de biofilmes.	24
Figura 6. Disposição das estirpes nas microplacas P24 nos ensaios de susceptibilidade.	25
Figura 7. Fotografia do gel de electroforese de Multiplex PCR para 12 estirpes de <i>L. monocytogenes</i> .	27
Figura 8. Avaliação da formação de biofilme pelo método do cristal violeta.	29
Figura 9. Comparação, entre condições de incubação na avaliação da formação de biofilme pelo método do cristal violeta.	30
Figura 10. Avaliação da formação de biofilme por enumeração celular, após 48 h de incubação a 25 °C.	31
Figura 11. Comparação da formação de biofilme por enumeração celular, após 48 h de incubação a 25 °C.	32
Figura 12. Avaliação da formação de biofilme por enumeração celular, após 7 dias de incubação a 11 °C.	33
Figura 13. Comparação da formação de biofilme por enumeração celular, após 7 dias de incubação a 11 °C.	34
Figura 14. Comparação na avaliação da formação de biofilme por enumeração celular, após 48 h de incubação a 25 °C e após 7 dias de incubação a 11 °C.	35
Figura 15. Tratamento de biofilmes, incubados em TSB-YE durante 48 h a 25 °C, com o desinfetante P3.	37
Figura 16. Tratamento de biofilmes, incubados em TSB-YE/10 durante 48 h a 25 °C, com o desinfetante P3.	38
Figura 17. Comparação da susceptibilidade dos biofilmes ao P3, após incubação em TSB-YE e TSB-YE/10, durante 48 h a 25 °C.	39
Figura 18. Tratamento de biofilmes, incubados em TSB-YE durante 7 dias a 11 °C, com o desinfetante P3.	41
Figura 19. Tratamento de biofilmes, incubados em TSB-YE/10, durante 7 dias a 11 °C, com o desinfetante P3.	42
Figura 20. Comparação da susceptibilidade dos biofilmes ao P3 OXONIA, após incubações em TSB-YE e TSB-YE/10, durante 7 dias a 11 °C.	44

Quadro 1. Sequência dos primers utilizados.	2
Quadro 2. Estirpes de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas no trabalho.	15
Quadro 3. Composição da mistura de amplificação.	20
Quadro 4. Programa do termociclador utilizado para o multiplex-PCR.	21

1. Introdução

1.1. Caracterização geral de *Listeria monocytogenes*

A descoberta oficial de *Listeria* foi no ano de 1924 num laboratório em Cambridge (Inglaterra), quando Murray, Webb e Swann isolaram *Listeria monocytogenes* como o agente que estava a causar doença septicémica em coelhos e porquinhos-da-Índia. O primeiro caso humano de listeriose foi reportado em 1929 na Dinamarca (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

Esta espécie pertence ao reino Bacteria, filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales, família Listeriaceae, género *Listeria*. Esta bactéria é anaeróbia facultativa, gram positiva com baixo conteúdo em G+C (38%) no seu genoma, caracterizada por bastonetes curtos não esporulados com 0,4 µm de diâmetro com comprimento entre 1 a 1,5 µm.

Actualmente, o género *Listeria* é composto por 17 espécies, sendo elas *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi* (Orsi, Bakker, & Wiedmann, 2011), *L. marthii* (Graves *et al.*, 2010), *L. rocourtiae* (Leclercq *et al.*, 2010), *L. weihenstephanensis* (Halter, Neuhaus, & Scherer, 2013), *L. fleischmannii* (Bertsch *et al.*, 2013), *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* e *L. grandensis* (den Bakker *et al.*, 2014), *L. newyorkensis* e *L. booriae* (Weller *et al.*, 2015). As espécies *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são as únicas consideradas patogénicas (Orsi & Wiedmann, 2016).

Sendo um patogéneo psicrotrófico, *L. monocytogenes* tem a capacidade de crescer dentro de uma ampla gama de temperaturas (2 – 45 °C) e também de pH (4,6 – 9,5). A temperatura óptima de crescimento pode variar entre os 30 °C e os 37 °C, mas consegue crescer e sobreviver a temperaturas de refrigeração (2 – 4 °C), o que torna o controlo deste patogéneo alimentar mais complicado (Gandhi & Chikindas, 2007).

Actualmente, são conhecidos 13 serótipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e e 7), caracterizados pelas diferenças conferidas pelas proteínas de superfície somáticas (O) e flagelares (H).

De acordo com o trabalho de Doumith *et al.* (2004a), existem três linhagens. A linhagem I engloba estirpes com os serótipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c. As estirpes com os serótipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e e 7 pertencem à linhagem II e estirpes com serótipos 4a e 4c pertencem à linhagem III.

Dos 13 serótipos identificados, os serótipos 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4c, 4d, 4e e 7 são pouco frequentes e raramente associados a casos de listeriose (Doumith *et al.*, 2004a). Apenas os serótipos 1/2a, 1/2b e 4b são responsáveis por mais de 98% dos casos reportados de listeriose

(Doumith *et al.*, 2004a), sendo o serótipo 1/2a mais frequente em alimentos e o serótipo 4b o que causa grande parte dos surtos de listeriose, sugerindo que este possui propriedades de virulência únicas (Borucki & Call, 2003). Porém, vários trabalhos (Aurora, Prakash, & Prakash, 2009; Chambel *et al.*, 2007; Hamdi *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2006; Pintado *et al.*, 2005) mostraram que existe prevalência do serótipo 4b em isolados de queijo.

A serotipagem tem sido usada em estudos epidemiológicos, para a caracterização de *L. monocytogenes*. Doumith *et al.* (2004a) propuseram um método de serotipagem molecular de *L. monocytogenes* baseado em PCR (*Polimerase Chain Reaction*). A técnica baseia-se na utilização de cinco pares de primers, que permitem o agrupamento dos isolados de *L. monocytogenes* em quatro grupos filogenéticos relacionados com o serótipo. As características dos pares de primers estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Sequência dos primers utilizados (Doumith *et al.*, 2004a).

Gene alvo	Sequência do primer	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Especificidade para o serovar
<i>Imo0737</i>	For: AGGGCTTCAAGGACTTACCC Rev: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	1/2a, 3a, 1/2c, e 3c
<i>Imo1118</i>	For: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA Rev: CGGCTTGTTCCGGCATACTTA	906	1/2c e 3c
ORF2819	For: AGCAAAATGCCAAACTCGT Rev: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	1/2b, 3b, 7, 4b, 4d, e 4e
ORF2110	For: AGTGGACAATTGATTGGTGAA Rev: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	4b, 4d, e 4e
<i>prs</i>	For: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev: CAAAGAAACCTTGGATTGCGG	370	Todas as espécies de <i>Listeria</i>

For – primer directo; Rev – primer reverso

L. monocytogenes pode ser isolada de uma grande diversidade de ambientes, incluindo solos, água, efluentes, fezes humanas e de animais, e de uma larga variedade de alimentos. Apesar da grande diversidade, pensa-se que material vegetal em decomposição será o seu habitat natural, onde sobrevive de forma saprófita (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

L. monocytogenes pode ser encontrada frequentemente em alimentos crus, processados e em produtos refrigerados prontos a comer (*ready-to-eat* (RTE)). Devido ao facto dos produtos RTE serem consumidos sem a necessidade de aquecimento prévio, apresentam um elevado risco para o consumidor. Neste contexto, o aumento do consumo de produtos RTE, devido às mudanças de hábitos dos consumidores, e as dificuldades existentes no controlo da temperatura na distribuição, podem ser algumas das razões que justificam o aumento de casos de listeriose nos últimos anos (Garrido, Vitas, & García-Jalón, 2010). Alguns exemplos de alimentos que podem transmitir o patógeno são o leite e outros lacticínios, carnes variadas e produtos cárneos (carne de vaca, porco, salsichas fermentadas), produtos frescos (saladas, rabanetes, couves), marisco e produtos de pesca (peixe fumado) (Rocourt & Cossart, 1997; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

A capacidade de sobrevivência em diferentes condições e a sua capacidade de formação de biofilmes na superfície de utensílios e equipamentos pode possibilitar o estabelecimento de isolados persistentes, o que pode levar a contaminações recorrentes em qualquer fase do processamento. O conhecimento e a compreensão dos factores que levam à sobrevivência deste microrganismo são essenciais para um controlo eficaz desta bactéria.

1.2. Listeriose e patogenicidade

A listeriose é a doença infecciosa causada por *L. monocytogenes* e pode ser contraída através do consumo de alimentos contaminados, podendo afectar tanto humanos como animais. *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são as duas únicas espécies patogénicas e têm a capacidade de invadir as células do hospedeiro.

O estabelecimento desta doença está dependente de três factores, o número de bactérias ingeridas através dos alimentos, a virulência da estirpe em questão e o estado imunológico do hospedeiro (Motarjemi, Moy, & Todd, 2014). Normalmente, *L. monocytogenes* tem capacidade de infectar humanos e animais, enquanto *L. ivanovii* é um patógeno animal (predominantemente ligado a doenças em ruminantes). Apesar de maioritariamente os casos de listeriose em humanos estarem relacionados com *L. monocytogenes*, no Reino Unido e na França já foram reportados casos de listeriose em humanos ligados a *L. ivanovii* (Garrido *et al.*, 2010).

A população de risco para esta doença inclui grávidas, adultos (55 anos ou mais) e imunocomprometidos, isto é, indivíduos que estejam dependentes de medicação supressora, de medicação anti-cancerígena ou que sejam portadores do vírus da imunodeficiência humana (VIH), doentes oncológicos, diabéticos, asmáticos e doentes com cirrose ou úlceras (McLauchlin *et al.*, 2004; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Os casos de listeriose em grávidas podem ocorrer em qualquer fase da gravidez, manifestando-se através de sintomas semelhantes a uma gripe ligeira, fadiga, dores musculares, dores nas articulações e dores de cabeça, podendo levar a abortos, nados-mortos ou meningite em recém-nascidos (Garrido *et al.*, 2010).

Na maioria dos casos (>70%), a listeriose em adultos afecta principalmente o sistema nervoso central provocando meningites e encefalites e também endocardites podendo ainda ocorrer septicemias (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b). McLauchlin *et al.* (2004) afirmam que a incidência de casos de listeriose aumenta com a idade, existindo mais casos em homens (com mais de 40 anos) do que em mulheres. Os pacientes imunocompetentes geralmente sobrevivem à infecção por *L. monocytogenes*, enquanto pacientes com doenças debilitantes acabam muitas vezes por morrer, correspondendo a uma taxa de mortalidade média de 30 – 40% (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

A listeriose é uma doença rara e com poucos casos reportados, comparando com outras doenças alimentares, existindo maior incidência de casos em países industrializados. De acordo com a EFSA (*European Food Safety Authority*), em 2014, foram reportados 2 161 casos de listeriose (0,52 casos por 100 000 habitantes na União Europeia) e uma taxa de mortalidade de 15%. Comparando com dados de 2013, verificou-se um aumento de 30% de casos. Os países com maior taxa reportada foram a Dinamarca, Suécia, Finlândia e Espanha (1,15 casos por 100 000 habitantes).

Portugal não reportou casos de listeriose para a EFSA entre 2007 e 2014 pois a doença não era de notificação obrigatória. Contudo, as autoridades têm registos da existência de pelo menos 46 casos de listeriose (taxa de mortalidade 43,5%), na mesma região (Lisboa e Vale do Tejo), entre Janeiro de 2009 e Fevereiro de 2011. A partir de Janeiro de 2015, a doença passou a ser de notificação obrigatória, segundo a DGS (Direcção-Geral de Saúde).

Em Espanha, entre 2009 e 2012, foram reportados anualmente 7 a 12 casos de listeriose. Foram confirmados dois casos de doenças em grávidas, estando associados à ingestão de queijo fresco. Contudo, entre Janeiro de 2013 e Fevereiro de 2014, foram detectados 27 casos, incluindo 11 casos associados a gravidez (de Castro *et al.*, 2012; Pérez-Trallero *et al.*, 2014).

A listeriose pode assumir duas formas: não-invasiva e invasiva. A forma não-invasiva corresponde a uma doença gastrointestinal com sintomas típicos como febre, diarreia e vômitos. Normalmente, os sintomas de infecção iniciam-se, aproximadamente, 20 horas após a ingestão de alimentos contaminados. A listeriose na forma invasiva já é reconhecida como uma infecção alimentar grave devido à severidade dos seus sintomas e à sua taxa de mortalidade elevada (Garrido *et al.*, 2010).

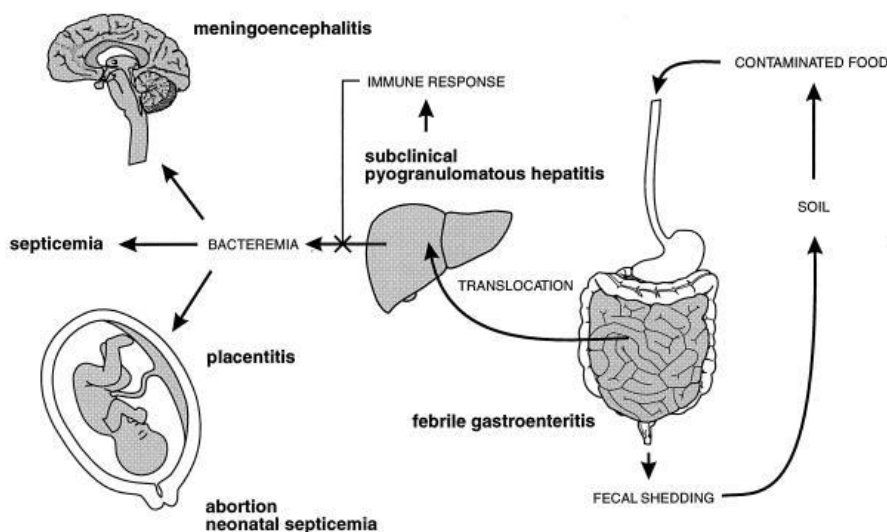


Figura 1. Representação esquemática da fisiopatologia de uma infecção por *Listeria* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

Após a ingestão de alimentos contaminados, o tracto gastrointestinal é o local de entrada das células patogénicas no hospedeiro (Garrido *et al.*, 2010). Assim, o processo de infecção (Fig. 1) é caracterizado pela colonização do tracto gastrointestinal, pela translocação das bactérias para o fígado e pela infecção do sistema nervoso central ou da placenta. Quando *L. monocytogenes* atravessa a barreira intestinal, as células são dispersadas e transportadas pela linfa e pelo sangue, chegando ao baço e fígado. Estes dois órgãos são os fundamentais para a posterior multiplicação bacteriana (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

A dose mínima necessária para causar infecção em humanos ainda não foi determinada, mas foram detectados valores altos (10^6 UFC/g) de *L. monocytogenes* em alimentos que causaram epidemias e casos esporádicos de listeriose. Não pode ser excluído o facto de baixas doses (10^2 – 10^4 UFC/g) poderem causar infecções em indivíduos pertencentes aos grupos de risco. A dose mínima também depende da virulência da estirpe (Garrido *et al.*, 2010; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

L. monocytogenes, bem com outras espécies patogénicas, contém genes de virulência. Estes genes estão organizados em ilhas de patogenicidade (PAIs). Estas ilhas estão dispersas pelo cromossoma e já foram identificadas duas ilhas, a ilha de patogenicidade LIPI-1 e a ilha de patogenicidade LIPI-2 (Hain, Steinweg, & Chakraborty, 2006; Vázquez-Boland et al., 2001a). O processo de invasão do hospedeiro é caracterizado pela presença de factores de virulência. Proteínas como a Internalina A (InlA) e a Internalina B (InlB) são factores fundamentais para a aderência e invasão da célula hospedeira. A invasão inicia-se quando a bactéria patogénica produz Internalina A e Internalina B, que irão interagir com receptores específicos da superfície celular do hospedeiro (E-caderina e c-Met, respectivamente) (Fig. 2[1]). Por consequência desta interacção, a bactéria é fagocitada e entra na célula do hospedeiro (Fig. 2[2]). A saída da bactéria do vacúolo requer a expressão de Listeriolisina O (LLO), toxina que forma poros e induz a lise da membrana do vacúolo, e das fosfolipases PlcA e PlcB (Fig. 2[3]). Uma vez ocorrida a lise, a bactéria é libertada para o citosol e multiplica-se rapidamente (Fig. 2[4]). A proteína de superfície (ActA) é então expressa. Esta proteína é necessária para a polimerização de filamentos de actina, permitindo que as bactérias se movam para a periferia da célula (Fig. 2[5]). Para que *L. monocytogenes* colonize outras células hospedeiras adjacentes, é expressa Internalina C com o objectivo de diminuir a tensão na superfície da célula (Fig. 2[6]). Com a diminuição da tensão, a bactéria tem capacidade de romper a superfície celular e é fagocitada pela célula adjacente, criando um novo ciclo de colonização (de las Heras et al., 2011; Garrido et al., 2010; Liu et al., 2007).

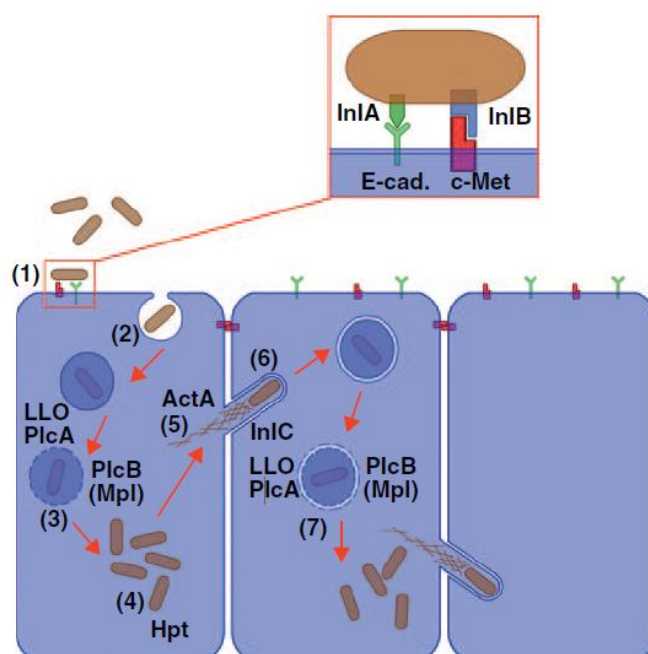


Figura 2. Invasão intracelular por *Listeria monocytogenes* (de las Heras et al., 2011).

1.3. *Listeria monocytogenes* na indústria alimentar

Em indústrias de processamento de alimentos, os equipamentos e utensílios com superfícies de aço inoxidável são reconhecidos como principal local para a aderência microbiana e a formação de biofilme (de Oliveira *et al.*, 2010). Esta aderência a superfícies que estão em contacto com alimentos pode levar a potenciais problemas sanitários e económicos, pois os biofilmes actuam como reservatórios de contaminação (Kumar & Anand, 1998; Shi & Zhu, 2009).

Vários microrganismos são capazes de realizar esta aderência e formação de biofilme, e *L. monocytogenes* é um dos patogéneos mais recorrentes. Esta bactéria tem uma distribuição ubíqua na natureza conseguindo, como já foi referido, sobreviver em condições ambientais adversas. Vários estudos indicam que *L. monocytogenes* tem mostrado capacidade de persistir no ambiente durante longos períodos (de Oliveira *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2006).

1.4. Biofilmes bacterianos

Um biofilme é definido como sendo uma matriz biologicamente activa de células aderidas a uma superfície e entre elas, incorporadas em polímeros extracelulares (PEC) (Kumar & Anand, 1998; Poulsen, 1999). Os PEC são normalmente polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, e funcionam como mediadores da aderência às superfícies, fornecem estabilidade mecânica ao biofilme, protegem as células de agressões externas e formam uma rede polimérica tridimensional que interliga e imobiliza as células do biofilme (Abee *et al.*, 2011; da Silva & De Martinis, 2013).

A formação de biofilmes causa problemas graves em sistemas de distribuição de águas residuais e nas indústrias alimentares, tornando aspectos como a limpeza e a desinfecção extremamente importantes (Poulsen, 1999; Shi & Zhu, 2009).

Os locais mais propícios à formação de biofilmes são cantos, juntas, articulações, fendas em tubagens ou sistemas de tubagem sem saída, e materiais como poliestireno, polipropileno, vidro, aço inoxidável, quartzo, mármore e granito. Na indústria, se o biofilme não for removido atempadamente, a sua espessura pode alterar o caudal (da Silva & De Martinis, 2013; Kumar & Anand, 1998; Poulsen, 1999).

Os biofilmes podem ser formados por todos os tipos de microrganismos, incluindo microrganismos patogénicos, e podem ser formados em todos os tipos de superfícies desde que

exista uma quantidade razoável de nutrientes disponíveis. Os microrganismos, de acordo com o seu modo de vida, podem ser planctónicos ou sésseis. No modo planctónico, os microrganismos vivem como organismos individuais que flutuam livremente, enquanto no estado sésil os microrganismos estão aderentes a uma superfície (Poulsen, 1999).

No caso de *L. monocytogenes*, a estrutura do biofilme pode variar dependendo das condições ambientais. Se as condições forem estáticas, o biofilme geralmente consiste numa camada homogénea de células em forma de bastonete e/ou de microcolónias. Se as condições de crescimento forem em corrente contínua, o biofilme poderá se formado por microcolónias em forma esférica (Abee *et al.*, 2011; Da Silva & De Martinis, 2013).

A aderência bacteriana é um processo que depende do tempo, e que é afectado pela disponibilidade de nutrientes no meio e pela fase de crescimento da população. Divide-se em duas etapas: a fase reversível e a fase irreversível.

Na fase reversível, os microrganismos estão próximos, mas não em contacto com a superfície e estão sob o efeito de forças de interacção de longa distância (forças de atracção de Van der Waals, forças electrostáticas e interacções hidrofóbicas).

Na fase irreversível, as forças repulsivas são predominantes, tentando prevenir as células bacterianas de entrarem em contacto com a superfície, apesar de mesmo assim ocorrer contacto devido à presença de flagelos, fímbrias, *pili* e PEC. As forças envolvidas são consideradas de alcance curto, incluindo interacções dipolo-dipolo, ligações iónicas e covalentes e interacções hidrofóbicas. Os PEC formam uma ponte de ligação entre as células e o substrato, criando uma associação irreversível com a superfície (Kumar & Anand, 1998; Poulsen, 1999). A produção de PEC está directamente relacionada com a capacidade de aderência. Estirpes bacterianas que não produzem PEC apresentam baixa capacidade de aderência, ao contrário das estirpes que produzem elevados teores de PEC, que apresentam grande capacidade de aderência a superfícies. Os PEC conferem protecção contra a fagocitose, interferem com a resposta imune celular e reduzem a eficácia dos antimicrobianos (de Carvalho, 2007).

As células bacterianas irreversivelmente aderidas crescem e multiplicam-se usando os nutrientes presentes no biofilme e nas proximidades. Esta situação leva a que sejam formadas microcolónias, que aumentam e se aglomeram para formar uma camada de células que cobre a superfície. Durante este período, as células aderidas produzem mais PEC, que facilitam a fixação das células à superfície e estabilizam as colónias.

A aderência das células bacterianas ao substrato e o crescimento microbiano associado à produção de PEC leva à formação do biofilme. A formação do biofilme é um processo demorado e o biofilme pode alcançar alguns milímetros de espessura em alguns dias, dependendo das condições. Acredita-se que a espessura do biofilme formado também está relacionada com a quantidade de espécies envolvidas, isto é, uma mistura de espécies forma normalmente um biofilme mais espesso que um biofilme formado apenas por uma única espécie (Kumar & Anand, 1998).

O crescimento do biofilme não é ilimitado. Este crescimento pode ser limitado devido a diversos factores, entre eles a disponibilidade de nutrientes, a acumulação de metabolitos tóxicos, os valores de pH e a concentração de oxigénio no interior do biofilme. A Figura 3 representa os processos envolvidos na formação e crescimento do biofilme.

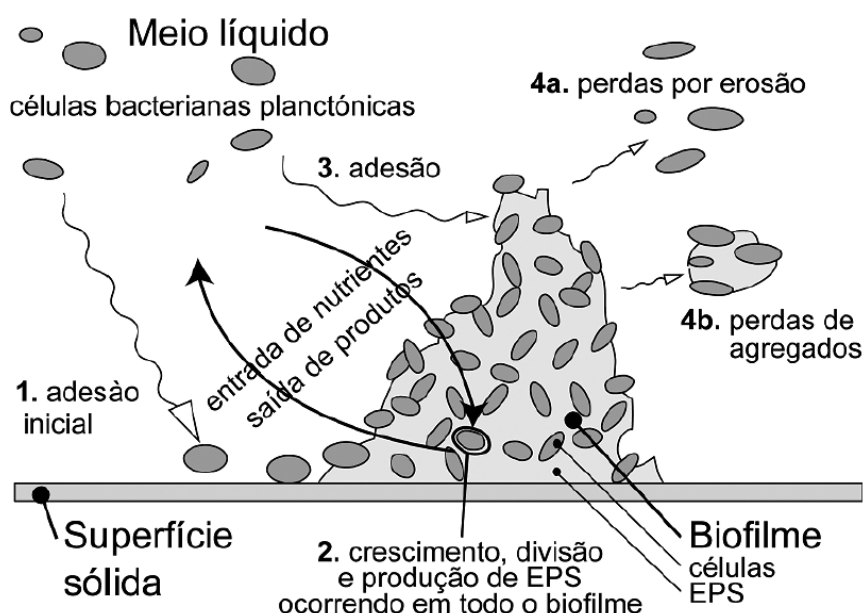


Figura 3. Representação do processo de formação e crescimento de biofilmes (Xavier *et al.*, 2003).

1.5. Suscetibilidade a antimicrobianos

Dado que a formação do biofilme é um processo demorado, é extremamente importante a existência de um método de higienização eficiente que previna a sua formação.

Na indústria alimentar, o processo de higienização é caracterizado por duas fases; primeiramente é realizada uma lavagem, e seguidamente a desinfecção. A etapa de lavagem consiste na remoção de restos de alimentos, microrganismos e objectos estranhos através da aplicação de produtos químicos nas superfícies, reduzindo a força de aderência à superfície (Gibson *et al.*, 1999; Motarjemi *et al.*, 2014). De acordo com Gibson *et al.* (1999), pensa-se que a etapa de lavagem é a mais importante por remover microrganismos aderidos e minimizar a colonização microbiana. A eficácia do processo de lavagem está dependente de diversos factores. Depende do tipo e quantidade de resíduos a serem removidos, das propriedades químicas e físico-químicas dos agentes de lavagem, da concentração e temperatura usadas durante a sua aplicação, da condição da superfície a ser lavada, do tipo e condição da superfície, isto é, algumas superfícies são mais difíceis de serem limpas e da presença de biofilmes (Motarjemi *et al.*, 2014). Apesar da lavagem efectuar uma remoção, esta não é completa. É realizada então uma desinfecção com o objectivo de reduzir a viabilidade dos microrganismos restantes até ao nível de aceitabilidade, através de meios físicos ou químicos (Gibson *et al.*, 1999; Asselt & Giffel, 2005). O desinfectante a ser aplicado deve ter tensão de superfícies suficiente para permitir uma melhor penetração, não causar corrosão ou outro tipo de danos nos equipamentos e ser facilmente dissolvido em água e a sua concentração deve ser facilmente determinada (Motarjemi *et al.*, 2014).

A eficácia do desinfectante a ser utilizado depende da concentração, do pH, da temperatura, do tempo de exposição, da higiene do equipamento, da dureza da água e da incompatibilidade com outros desinfectantes, uma vez que a maioria dos desinfectantes são incompatíveis entre si (Motarjemi *et al.*, 2014).

Os processos de lavagem e desinfecção podem ser realizados através de vários métodos. Na indústria alimentar, o método de higienização de equipamentos é normalmente feito através de sistemas CIP (*Clean-In-Place*). O CIP é um sistema de higienização automático, onde a higienização das válvulas, do equipamento e das tubagens é feita *in place*, isto é, não é necessário desmontar os equipamentos para se efectuar a sua higienização (Motarjemi *et al.*, 2014).

Estão disponíveis no mercado uma vasta gama de desinfectantes para a indústria alimentar, e podem ser divididos em sete grupos: álcoois, aldeídos, biguaninas, bis-fenóis, agentes halogénicos, peróxidos e compostos quaternários de amónio (Asselt & Giffel, 2005). Os desinfectantes são, geralmente, altamente activos contra microrganismos, embora potencialmente perigosos para os humanos, devido à sua capacidade de actuar em diversos

locais da célula bacteriana, incluindo alguns componentes celulares (ácidos nucleicos, proteínas e enzimas) e membranas celulares (proteínas e transportadores membranares) (Mcdonnell & Russell, 1999).

Na indústria alimentar, são frequentemente utilizados desinfetantes baseados em peróxidos e em compostos quaternários de amónio (Holah *et al.*, 2002). No presente trabalho, foi utilizado um desinfetante comercial P3 OXONIA, em que o peróxido de hidrogénio e o ácido peracético são os compostos activos.

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é amplamente aplicado na indústria alimentar e é comercializado em concentrações que variam entre 3 a 90% (v/v). É considerado “amigo do ambiente” devido à sua capacidade de se dissociar, rapidamente, em água e oxigénio. Em geral, é observada uma maior acção contra bactérias gram-positivas do que contra bactérias gram-negativas. Contudo, em bactérias gram-negativas, a presença de catalase ou de outros peróxidos pode aumentar a tolerância bacteriana a concentrações baixas do produto. O ácido peracético (CH_3COOOH) é considerado um biocida mais potente que o peróxido de hidrogénio (Mcdonnell & Russell, 1999). O ácido peracético é um ácido fraco que se decompõe, tal como o peróxido de hidrogénio, em produtos seguros (ácido acético e oxigénio). De forma semelhante ao que acontece com o peróxido de hidrogénio, o ácido peracético desnatura proteínas, enzimas e aumenta a permeabilidade da parede celular (Mcdonnell & Russell, 1999; Asselt & Giffel, 2005).

Diferentes autores (Caixeta *et al.*, 2012; Kostaki *et al.*, 2012; Królasik *et al.*, 2010; Pan, Breidt, & Kathariou, 2006) estudaram a eficácia do peróxido de hidrogénio e do ácido peracético na eliminação de biofilmes microbianos.

As falhas nos processos de limpeza e de higienização nas indústrias alimentares proporcionam, frequentemente, o aparecimento de microrganismos patogénicos, como *L. monocytogenes*, na forma planctónica ou em biofilmes (Wirtanen & Salo, 2003). Quando existe formação de biofilme, o desinfetante tem que ser capaz de dissolver os PEC, permitindo assim a remoção das células, ou tem que ser capaz de penetrar os PEC, inactivando as células (Chmielewski & Frank, 2007).

Tal como outros organismos vivos, os microrganismos para se defenderem de ambientes adversos, têm a capacidade de adquirir resistência (menor susceptibilidade) contra a acção dos desinfetantes. Esta resistência varia dependendo do tipo de microrganismos (Mcdonnell & Russell, 1999).

Cloete (2003) definiu o conceito de resistência como a capacidade temporária ou permanente de um organismo se manter viável e/ou multiplicar-se sob condições que poderiam destruir ou inibir outros membros da mesma espécie. Em 2002, Holah *et al.* afirmaram que os microrganismos resistentes podem ser descritos como espécies ou estirpes que foram capazes de sobreviver, repetidamente, a programas de lavagem e desinfecção, dominando a microbiota do ambiente. De acordo com (Taylor, Rogers, & Holah, 1999), os microrganismos tem grande capacidade de resistir a desinfetantes, a temperaturas baixas, normalmente associadas à produção de alimentos refrigerados.

Mcdonnell & Russell (1999) descreveram resistência como sendo intrínseca (propriedade natural do organismo ou do seu modo de crescimento) ou adquirida, por mutação ou aquisição de plasmídeos ou transposões. A indústria alimentar reconhece que algumas espécies são, intrinsecamente, mais resistentes a biocidas do que outras. Vários estudos demonstraram que várias estirpes mostram susceptibilidade a agentes de limpeza e desinfecção (Aase *et al.*, 2000; Heir *et al.*, 2004; Mereghetti *et al.*, 2000) embora, estirpes persistentes ou estirpes originadas da indústria cárnea tenham apresentado menos susceptibilidade (Aase *et al.*, 2000; Heir *et al.*, 2004).

Para além destes factores, a resistência dos microrganismos também é influenciada pelo estado em que as células se encontram. Normalmente, um biofilme apresenta maior resistência a desinfetantes do que as células planctónicas. Em biofilmes, a resistência contra agentes de limpeza e antibióticos aumenta com a fase de crescimento e com a idade do biofilme (Belessi *et al.*, 2011; Chmielewski & Frank, 2007; Srey, Jahid, & Ha, 2013).

1.6. Persistência

O termo persistência origina frequentemente alguma confusão, podendo adquirir uma variedade de significados, dependendo do contexto do patógeno alimentar (Ferreira *et al.*, 2014). Persistência é definida como o isolamento da mesma estirpe, a partir do mesmo local por um prolongado período de tempo (Holah, Bird, & Hall, 2004). Alguns autores vão mais além e definem persistência como sendo a sobrevivência a longo prazo (tipicamente sem crescimento) de um patógeno num hospedeiro, ou presente em alimentos (Ferreira *et al.*, 2014).

Larsen *et al.* (2014) referem que persistência significa que determinados tipos de microrganismos sobrevivem por períodos prolongados de tempo em certos habitats. A

persistência de um patógeno depende de muitos factores, como o habitat físico e microbiano, vias de transmissão e determinantes genéticos.

A persistência pode causar contaminação dos alimentos, e pôr em risco a segurança alimentar, criando problemas na saúde pública (Pricope *et al.*, 2013). Persistência refere-se, sempre, a uma matriz específica ou ambiente, seja solo, alimentos para animais, ambientes de produção agrícola, ambientes de processamento de alimentos ou os próprios alimentos (Larsen *et al.*, 2014). Rørvik, Caugant, & Yndestad (1995) reportaram, pela primeira vez, persistência de *L. monocytogenes* numa fábrica de peixe (fumeiro de salmão), na Noruega.

Os biofilmes contribuem para a persistência, em ambientes desfavoráveis, porque proporcionam versatilidade fenotípica e ecológica, incluindo protecção contra o ambiente (proporcionada pelos PEC envolventes da matriz), aumento da disponibilidade e cooperação metabólica através da troca de nutrientes e eliminação de metabolitos potencialmente tóxicos e aquisição de novas características genéticas (genes de resistência a antibióticos) (Ferreira *et al.*, 2014).

No geral, a associação entre a capacidade de aderência a superfícies das estirpes de *L. monocytogenes*, e/ou a formação de biofilme, com a persistência das estirpes na indústria alimentar ainda não é clara (Ferreira *et al.*, 2014). De acordo com Carpentier & Cerf (2011), suspeita-se que a persistência está ligada à resistência das estirpes quando estão em contacto com desinfetantes. Estes autores afirmam, também, que a persistência está relacionada com a habilidade de sobrevivência e crescimento a baixas temperaturas.

1.7. Estudo da capacidade de formação de biofilmes

São variadas as metodologias utilizadas para a avaliação da capacidade de formação de biofilme das bactérias. O método do cristal violeta foi proposto em 1985 por Christensen *et al.* e posteriormente adaptado por Borucki *et al.* (2003), Djordjevic, Wiedmann, & McLandsborough (2002), Lourenço *et al.* (2012) e Stepanović *et al.* (2004). É um método amplamente utilizado, envolvendo o crescimento do biofilme em microplacas, coloração com cristal violeta, solubilização do corante ligado e a medição da sua absorvância.

Outros métodos de avaliação de biofilmes baseiam-se na remoção das células do material de superfície e inoculação da suspensão de células resultantes, para determinar o número de unidades formadoras de colónias (UFC). O uso de superfícies de aço inoxidável para o

crescimento dos biofilmes é frequente (Frank & Koffi, 1990; Moltz & Martin, 2005), sendo que é o material utilizado em equipamentos de produção na indústria alimentar, devido à sua estabilidade físico-química e elevada resistência à corrosão (Shi & Zhu, 2009).

1.8. Objectivos do trabalho

O objectivo principal deste estudo foi caracterizar um conjunto de estirpes persistentes com origem em indústrias de carne de suínos e de aves, em Espanha, relativamente à sua capacidade de formação de biofilme, bem como à susceptibilidade dos biofilmes formados a um desinfectante comercial (P3 OXONIA), baseado em peróxido de hidrogénio e ácido peracético.

Foram utilizadas 12 estirpes de *L. monocytogenes*. Das estirpes utilizadas, três estirpes persistentes foram isoladas de uma empresa de produtos de carne de frango e seis estirpes persistentes foram isoladas de empresas de enchidos de carne de porco. Três estirpes foram utilizadas como controlos. As estirpes foram avaliadas a duas temperaturas (11 °C e 25 °C) simulando uma temperatura de refrigeração e a temperatura ambiente numa indústria alimentar. Os biofilmes foram produzidos em meio rico (TSB-YE) e em meio diluído (TSB-YE/10) de modo a simular condições de limpeza deficiente ou eficaz, respectivamente.

Estes resultados irão complementar a informação já existente sobre as estirpes persistentes utilizadas e contribuir com nova informação ligada à sua erradicação através do uso de desinfectantes à base de peróxido de hidrogénio e ácido peracético.

2. Material e métodos

2.1. Estirpes utilizadas

Foram utilizadas 12 estirpes de *L. monocytogenes*, isoladas a partir da indústria de carne, em Espanha, e realizado um Multiplex PCR (ver 3.2.) para determinar os respectivos serogrupos (Quadro 2).

Quadro 2. Estirpes de *L. monocytogenes* utilizadas no trabalho.

Referência original	Referência CBISA	Origem
R6 ¹	4471	(López <i>et al.</i> , 2013)
S1(R) ²	4472	(Ortiz <i>et al.</i> , 2014; Ortiz <i>et al.</i> , 2016)
S2BAC ^{2,4}	4473	(Ortiz <i>et al.</i> , 2014)
EGD-e ³	4474	(Ortiz <i>et al.</i> , 2014; Ortiz <i>et al.</i> , 2016)
S2-1 ²	4475	(Ortiz <i>et al.</i> , 2014)
S1(S) ²	4476	(Ortiz <i>et al.</i> , 2014; Ortiz <i>et al.</i> , 2016)
4423 ³	4477	(Ortiz <i>et al.</i> , 2016)
S10-1 ²	4478	(Ortiz <i>et al.</i> , 2014; Ortiz <i>et al.</i> , 2016)
S2-2 ²	4479	(Ortiz <i>et al.</i> , 2016)
CDL69 ³	4480	(Ortiz <i>et al.</i> , 2016)
A7 ¹	4481	(López <i>et al.</i> , 2008)
P12 ¹	4482	(López <i>et al.</i> , 2007)

CBISA – Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia

¹ Estirpes isoladas de empresa de carne de frango espanhola

² Estirpes isoladas de empresa de enchidos de carne de porco espanhola

³ Estirpes controlo

⁴ Mutante artificial resistente a BAC

2.2. Meios de cultura

Todos os meios líquidos e sólidos, após reconstituição, foram esterilizados durante 15 minutos a 121 °C. Sempre que foi necessária a utilização de água para a preparação de meios e soluções, e quando nada se disser em contrário, utilizou-se água destilada.

Tryptone Soy Broth with Yeast Extract (TSB-YE)

Dissolver 30 g de TSB desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) e 6 g de extracto de levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) em 1 L de água.

Tryptone Soy Agar with Yeast Extract (TSA-YE)

Dissolver 30 g de TSB desidratado e 6 g de extracto de levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, França). Adicionar 20 g de agar (Iberagar, Portugal) e perfazer o volume com água até 1 L.

Para preparar TSA-YE semi-sólido, dissolver 30 g de TSB desidratado e 6 g de extracto de levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, França). Adicionar 10 g de agar (Iberagar, Portugal) e perfazer o volume com água até 1 L. Após a esterilização, deixar arrefecer até 56 °C e distribuir por tubos criogénicos de 3 mL.

COMPASS® Listeria Agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, França)

- Meio base

Dissolver 71,9 g de meio base desidratado (BK192) em 1 L de água e distribuir o volume por frascos de 100 mL. Após a esterilização, deixar arrefecer e manter entre 44 e 47 °C.

Reconstituir o suplemento selectivo liofilizado (BS017) adicionando 10 mL de água esterilizada. Para cada 100 mL de meio base, adicionar 1 mL de suplemento selectivo reconstituído e 3 mL de suplemento enriquecido (BS070).

2.3. Soluções

Solução de Ringer (SR)

Dissolver um comprimido de SR (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) em 500 ml de água.

Etanol 95% (v/v)

Diluir 238 mL de etanol (Aga, Lisboa, Portugal) de 99,5% (v/v) em 11,5 mL de água esterilizada.

Cristal violeta 0,1% (m/v)

Diluir 0,05 g corante Cristal Violeta (Acrós Organics, Geel, Bélgica) em 50 mL de água.

Água dura (soluções)

A preparação da água dura foi feita de acordo com a EN 13697 (2001).

Solução A – Dissolver 19,84 g de $MgCl_2$ e 46,24 g de $CaCl_2$ em 1 L de água.

Solução B – Dissolver 35,02 g de $NaHCO_3$ em 1 L de água.

Desinfetante P3 OXONIA (P3)

Os compostos activos do P3 OXONIA (ECOLAB S.r.l.) são o peróxido de hidrogénio e o ácido peracético.

Para preparar 50 mL de P3 a 0,5% (v/v), adicionar 49,3 mL de água, 0,3 mL de solução A, 0,4 mL de solução B. Retirar 0,25 mL de solução e substituir por 0,25 mL de P3.

Para preparar 50 mL de P3 a 1% (v/v), proceder de igual modo, excepto que o volume de solução a substituir pelo P3 é de 0,5 mL.

Dey/Engley neutralizing broth (D/E)

Dissolver 39 g de D/E (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) em 1 L de água.

Tampão de lise

Para um volume de 1 ml adicionar 25 μ L de SDS 10% (m/v), 5 μ L de NaOH 10 M e perfazer com água Mili-Q esterilizada.

TAE 1x

Preparar 1L de solução *stock* (TAE 10x) misturando 48,4 g de Tris (National Diagnostics, Atlanta, EUA), 11,42 mL de ácido acético glacial (96%) (Panreac, Barcelona Espanha), 20 mL de

EDTA 0,5M (pH 8,0) em água. Para preparar 1 L de TAE 1x, executar uma diluição de razão 1/10, em volume apropriado.

Agarose 1,4% (m/v)

Pesar 1,75 g de agarose (Lonza, Rockland ME, USA). Juntar 125 mL de TAE 1x e aquecer, em microondas, até à dissolução da agarose.

2.4. Condições de crescimento das estirpes bacterianas

Em meio líquido

As bactérias foram inoculadas em meio TSB-YE e incubadas durante a noite a 37 °C, para serem usadas, posteriormente, nos ensaios de formação de biofilmes pelos métodos do cristal violeta e enumeração celular.

Em meio sólido

As bactérias foram inoculadas por riscado à superfície de meio TSA-YE e incubadas a 37 °C durante 18 a 24 horas.

2.5. Ensaios prévios

2.5.1. Confirmação das estirpes

Para a confirmação da pureza das culturas, efectuou-se a inoculação, em meio TSA-YE, e em meio COMPASS® *Listeria* Agar. Neste último, as colónias de *L. monocytogenes* apresentam uma cor azul-esverdeada e são rodeadas por um halo opaco.

2.5.2. Serotipagem molecular: Multiplex PCR

A serotipagem molecular das estirpes foi efectuada de acordo com o método proposto por Doumith *et al.* (2004a) e descrita a seguir.

Obtenção dos lisados

As estirpes foram inoculadas por riscado em placas de TSA-YE e posteriormente incubadas durante 18 a 24 horas a 37 °C.

De cada estirpe, foram retiradas 3 a 5 colónias das placas de TSA-YE que se ressuspenderam em 50 µL de tampão de lise.

As suspensões assim obtidas foram incubadas a 100 °C durante 10 minutos, e posteriormente arrefecidas à temperatura ambiente. Foi adicionado, a cada suspensão, 250 µL de água Mili-Q esterilizada.

Primers utilizados

Para a realização da serotipagem, foram utilizados os 5 pares de primers descritos no Quadro 1 (ver 1.1).

Mistura de amplificação

No Quadro 3 está descrita a composição da mistura utilizada na reacção de amplificação (Doumith *et al.*, 2004a).

Quadro 3. Composição da mistura de amplificação.

Componentes	Concentração final/volume (μL)
Água Mili-Q	- / 0,5
MgCl ₂ (Invitrogen)	2 mM/1
Primer directo para o gene <i>lmo0737</i>	1 mM/1
Primer reverso para o gene <i>lmo0737</i>	1 μM/1
Primer directo para a ORF2819	1 μM/1
Primer reverso para a ORF2819	1 μM/1
Primer directo para a ORF2110	1 μM/1
Primer reverso para a ORF2110	1 μM/1
Primer directo para o gene <i>lmo1118</i>	1,5 μM/1
Primer reverso para o gene <i>lmo1118</i>	1,5 μM/1
Primer directo para o gene <i>prs</i>	0,2 μM/1
Primer reverso para o gene <i>prs</i>	0,2 μM/1
Mix NZytag 2x Colourless Master-Mix*	2,5 U/12,5
Amostra	- / 1
Total	25 μL

* Contém Taq DNA polimerase, os 4 dNTPs e o tampão da Taq DNA polimerase

Foi preparado um *master-mix* com todos os constituintes excluindo a amostra, para 14 reacções e colocado em gelo. Distribuiu-se o master-mix por 13 microtubos (24 μL/microtubo) e colocaram-se novamente no gelo. Seguidamente, adicionaram-se as amostras (1 μL) aos respectivos tubos em gelo (12 estirpes). O volume total da reacção foi de 25 μL.

Para se verificar a ausência de contaminações, foi efectuado um tubo controlo, onde a amostra foi substituída por água Mili-Q esterilizada.

Condições de amplificação

O Quadro 4 indica as condições experimentais necessárias para a reacção de amplificação no termociclador Thermo Scientific Piko Thermal Cycler.

Quadro 4. Programa do termociclador utilizado para o multiplex-PCR.

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Etapas
1	94	180	Desnaturação inicial
35	94	24	Desnaturação
	53	69	Emparelhamento
	72	69	Extensão
1	72	420	Extensão complementar

Electroforese em gel de agarose

Depois da reacção terminar, misturou-se 10 µL de cada amostra com 5 µL de tampão de amostra (50% glicerol, 0,1% (m/v) de azul de bromofenol). Foi usado como marcador molecular o NZYDNA Ladder VI (5 µL de Ladder com 5 µL de tampão de amostra).

Os produtos de PCR resultantes foram sujeitos a electroforese em gel de agarose (1,4% (m/v), adicionado de Gel Red* 10.000x) em tampão TAE 1x, durante 2 h a 60 V.

Após este período, o gel foi visualizado e fotografado com o analisador de imagens Bio-Rad Gel Doc 2000™ (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milão, Itália).

2.6. Formação de biofilmes e resposta aos agentes desinfectantes

Os métodos de avaliação de formação de biofilme têm sido estudados ao longo dos últimos anos, mediante diferentes abordagens. Abaixo, estão descritos dois desses métodos, que permitem a quantificação do biofilme.

Para todos os métodos, efectuaram-se dois ensaios biológicos. Na execução do método do cristal violeta (CV), para cada ensaio biológico, foram efectuadas oito réplicas técnicas para cada estirpe. Na execução dos métodos de enumeração celular (EC) e de susceptibilidade ao P3 OXONIA, por cada ensaio biológico, foram efectuadas duas réplicas técnicas, para cada estirpe.

2.6.1. Método do cristal violeta (CV)

Para avaliar a capacidade das diversas estirpes de *L. monocytogenes*, na formação do biofilme, foi executado o método do cristal violeta proposto por Djordjevic *et al.* (2002) e adaptado a partir do trabalho realizado por Lourenço *et al.* (2012). Esta metodologia é baseada na capacidade de coloração que o CV tem ao atravessar a parede celular das células bacterianas.

Após incubação em TSA-YE a 37 °C, de cada estirpe, foram retiradas 5 colónias isoladas que foram re-suspensas em 5 mL de TSB-YE e incubadas, durante a noite, a 37 °C. Para cada estirpe, misturou-se 1 mL de cultura com 4 mL de TSB-YE fresco e levou-se ao vortex, durante 15s.

A partir destas suspensões, foram inoculados, em microplaca P96, 150 µL por poço, de acordo com a Figura 4. Os poços não inoculados foram preenchidos com 150 µL de água esterilizada. Os poços da coluna 12 constituíram o controlo negativo (meio não inoculado). Depois de inoculada, a microplaca foi selada com Parafilm®, de modo a prevenir a possível evaporação durante a incubação. Foram realizados ensaios para dois períodos e temperaturas de incubação: 48 horas a 25 °C; 7 dias a 11 °C. As incubações foram realizadas com uma velocidade de agitação de 150 rpm.

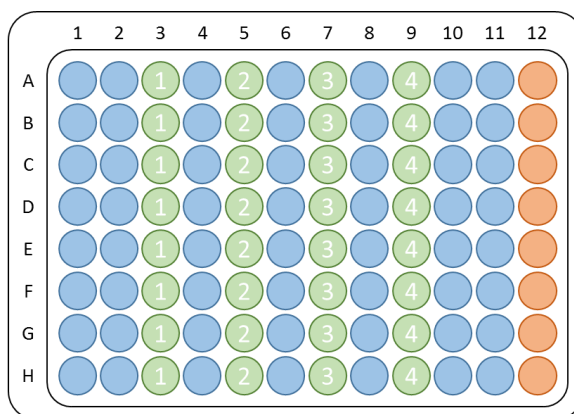


Figura 4. Disposição das estirpes nas microplacas P96 (os números de 1 a 4 representam 4 das 12 estirpes a testar). As colunas com cor azul foram preenchidas com água, a coluna com cor laranja representa o controlo negativo (TSB-YE não inoculado) e as colunas com cor verde representam os poços inoculados.

Após o período de incubação, verteu-se o conteúdo dos poços para uma tina de vidro e foram feitas três lavagens com 150 µL de água, deixando as placas a secar invertidas, durante 30 minutos.

Após a secagem, todos os poços inoculados e controlos foram corados com 50 µL de CV a 0,1% (v/v), deixando-se actuar durante 45 minutos. Foram realizadas três lavagens com 150 µL de água Mili-Q para remoção do corante não fixado pelo biofilme. A placa foi colocada em posição invertida e deixada a secar durante 30 minutos.

Por fim, foram adicionados 200 µL de álcool a 95% (v/v) e deixado a solubilizar durante 30 minutos a 4 °C, para evitar a evaporação do álcool. Depois do período de solubilização, foram retirados de cada poço 100 µL para os respectivos poços de uma nova microplaca P96 e foi medida a absorvância a 600 nm.

2.6.2. Enumeração celular (EC) em *coupons* de aço inoxidável

Esta metodologia foi utilizada para determinar o número de UFC nos biofilmes. O método utilizado foi adaptado do trabalho realizado por Costa *et al.* (2016). Assim, para testar a capacidade de formação de biofilme, as estirpes foram inoculadas em placas P24 com *coupons* de aço inoxidável (1 x 1 cm) finish 316 4b (University of Georgia instrument shop, Athens, GA).

- Tratamento dos *coupons*

Antes de serem utilizados, os *coupons* foram tratados com acetona para remover a possível gordura existente, passados por água destilada e, de seguida, imersos em detergente, com base em ácido fosfórico, durante 20 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, foram passados novamente por água destilada. Os *coupons* foram então colocados em tubos de ensaio e autoclavados durante 15 minutos à temperatura de 121 °C.

- Produção de biofilmes

Para cada estirpe, após a incubação em TSA-YE a 37 °C, foram retiradas 5 colónias isoladas que se re-suspenderam em 5 mL de TSB-YE, seguido da incubação, durante a noite a 37 °C. Misturou-se 1 mL de cada cultura assim obtida com 4 mL de TSB-YE e levou-se ao vortex durante 15 s.

Em cada placa P24 foi colocado um *coupon* por poço. Foram avaliadas cinco estirpes por placa em meio rico (TSB-YE) e em meio diluído (TSB-YE/10), respectivamente, de acordo com o esquema apresentado na Figura 5. Os poços com os *coupons* foram sempre adicionados de 1,5

mL de suspensão bacteriana (cerca de 10^7 UFC/mL), ou nos poços com TSB-YE/10, 150 μ L de suspensão (10^6 UFC/mL) e 1,35 mL de SR. Nos poços controlo (negativo) o volume de suspensão foi substituído por igual volume de meio de cultura.



Figura 5. Disposição das estirpes nas microplacas P24 para produção de biofilmes (os números de 1 a 5 representam 5 das 12 estirpes a testar, em TSB-YE e TSB-YE/10, representadas a verde e a azul, respectivamente). Estão indicados, a laranja, os poços destinados aos controlos negativos (TSB-YE e TSB-YE/10).

As microplacas foram seladas com Parafilm® e de seguida incubadas a 25 °C durante 48 horas, repetindo-se o mesmo procedimento para a incubação a 11 °C durante 7 dias.

- Remoção do biofilme

Numa nova microplaca P24 foram colocadas 20 esferas de vidro ($\varnothing = 3$ mm) por poço. Após o período de incubação dos biofilmes, cada *coupon* de aço inoxidável foi lavado com SR, pipetando-se 1 mL em cada face do *coupon*, de modo a serem retiradas todas as células não aderentes. Cada *coupon* foi colocado no poço correspondente da nova microplaca P24 com esferas e foram adicionadas mais 30 esferas de vidro, por poço e 1 mL de SR.

A microplaca foi agitada num vortex de microplacas (Tittertek DSG, Flowlabs, Germany) durante 1 minuto, para que fosse removido o biofilme de ambas as faces dos *coupons*.

De cada poço, foram retirados 100 µL de suspensão celular e adicionados a 900 µL de SR e as diluições decimais prosseguiram até 10⁻⁴.

De cada uma das diluições, foram espalhados 100 µL em placas TSA-YE que foram incubadas, durante a noite a 37 °C para contagem de UFCs.

2.6.3. Avaliação da susceptibilidade, do biofilme, ao P3 OXONIA através de redução logarítmica

O procedimento utilizado para o tratamento dos coupons e para a produção de biofilmes foram os descritos em 4.2.

A Figura 6 exemplifica a disposição das estirpes e dos controlos na microplaca.



Figura 6. Disposição das estirpes nas microplacas P24 nos ensaios de susceptibilidade (os números de 1 a 4 representam 4 das estirpes a testar em TSB-YE e TSB-YE/10 (verde e vermelho, respectivamente)). A laranja estão indicados os poços destinados aos controlos negativos (TSB-YE e TSB-YE/10 não inoculados) e a azul estão indicados os poços destinados aos controlos positivos para cada estirpes (inoculados e não expostos ao P3).

Após o período de incubação (48 horas a 25 °C ou 7 dias a 11 °C), cada *coupon* foi lavado com SR, pipetando-se 1 mL em cada face do *coupon*, de modo a serem retiradas todas as células planctónicas. Cada *coupon* foi colocado no poço correspondente da uma nova microplaca P24.

Foi adicionado 1 mL de P3 em todos os poços da microplaca P24, à excepção dos poços reservados aos controlos. Foram realizados ensaios para dois tempos de exposição, 5 minutos e 7,5 minutos.

Numa outra microplaca P24 foram colocadas 20 esferas de vidro por poço. Após o tempo de exposição ao desinfectante, cada *coupon* foi lavado com 1 mL de SR e colocado no poço correspondente desta placa. Em todos os poços foram colocadas 30 esferas de vidro e foi adicionado 1 mL de D/E, com o objectivo de neutralizar o desinfectante.

Após 5 minutos de neutralização, a microplaca foi agitada no vortex durante 1 minuto, para remoção do biofilme. De cada poço foram retirados 100 µL desta suspensão e adicionados a 900 µL de SR. As diluições decimais prosseguiram até 10^{-4} .

De cada uma das diluições, foram espalhados 100 µL em placas TSA-YE, seguido de incubação durante a noite, a 37 °C para contagem de UFCs.

A redução logarítmica foi efectuada subtraindo ao valor médio dos resultados obtidos em EC (duas réplicas biológicas, cada uma com duas réplicas técnicas) o valor médio dos resultados obtidos após exposição ao P3 (duas réplicas biológicas, cada uma com duas réplicas técnicas). O tratamento é considerado efectivo quando é observada uma redução logarítmica superior a 4.

2.7. Análise de dados

Os dois métodos utilizados para a avaliação da capacidade de formação de biofilmes das estirpes forneceram diferentes tipos de resultados: valores de absorvância a 600 nm, a partir do método do CV e valores em Log UFC/cm², a partir da EC em coupons de aço inoxidável.

Os dois tipos de dados foram sujeitos a ANOVA, utilizando o programa MiniTab 17 (Minitab, Inc., Pennsylvania, USA). Quando não se observou normalidade na distribuição dos resultados, realizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. Sempre que a normalidade e a homogeneidade da variância foram confirmadas, efectuou-se uma ANOVA a um factor usando o teste de Tukey. Para ambos os casos, foi usado o programa Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). Para todos os testes efectuados, o nível de confiança foi 95% ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1. Serotipagem molecular: Multiplex PCR

Com o intuito de caracterizar as estirpes a serem estudadas, procedeu-se a uma serotipagem molecular por Multiplex PCR. A partir dos resultados obtidos verificou-se que todas as estirpes em estudo pertencem ao mesmo serogrupo, 1/2a – 3a (Fig. 7).

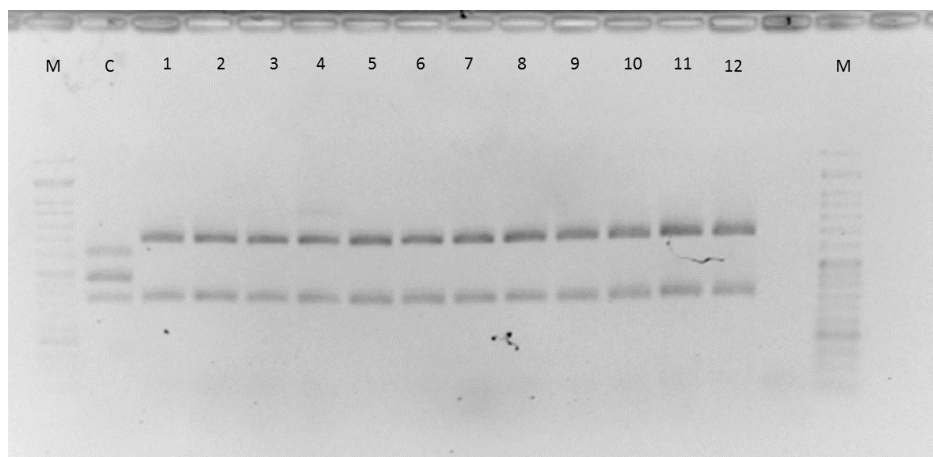


Figura 7. Fotografia do gel de electroforese de Multiplex PCR para 12 estirpes de *L. monocytogenes* (1 – 12).

C – Controlo (CBISA – 3001; serogrupo 4b); M – Marcador molecular (NZYDNA Ladder VI)

3.2. Avaliação da formação de biofilme

Na indústria alimentar, em geral, são usados vários materiais como vidro, aço inoxidável, poliestireno, PVC e outros. Está provado que *L. monocytogenes* tem a capacidade de aderir e colonizar estas superfícies e formar biofilmes (Jeong & Frank, 1994).

Neste trabalho, a formação de biofilme foi analisada em materiais hidrofílicos (aço inoxidável) e hidrofóbicos (poliestireno). O principal objectivo foi estudar a capacidade de formação de biofilmes e a susceptibilidade, a um desinfectante comercial, de 12 estirpes de *L. monocytogenes*.

3.2.1. Método do cristal violeta

O método de coloração pelo cristal violeta, utilizando microplacas de poliestireno, é utilizado frequentemente para avaliar a capacidade de produção de biofilme, corando a biomassa total, incluindo células vivas e mortas, não fornecendo assim informação de qual o número de células viáveis (Kadam *et al.*, 2013).

Em concordância com outros estudos (Borucki *et al.*, 2003; Harvey, Keenan, & Gilmour, 2007; Kadam *et al.*, 2013; Nilsson, Ross, & Bowman, 2011), todas as estirpes de *L. monocytogenes* analisadas demonstraram ter capacidade de formar biofilmes.

A avaliação da capacidade das 12 estirpes foi feita através da leitura da absorvância (Abs) para o comprimento de onda de 600 nm. Os períodos de incubação foram de 48 horas a 25 °C e de 7 dias a 11 °C.

A formação de biofilme a 25 °C mostrou uma variação de valores de absorvância entre 0,128 e 0,221 (Fig. 8A). A variação dos valores de absorvância para biofilmes produzidos a 11 °C foi de 0,113 a 0,150 (Fig. 8B).

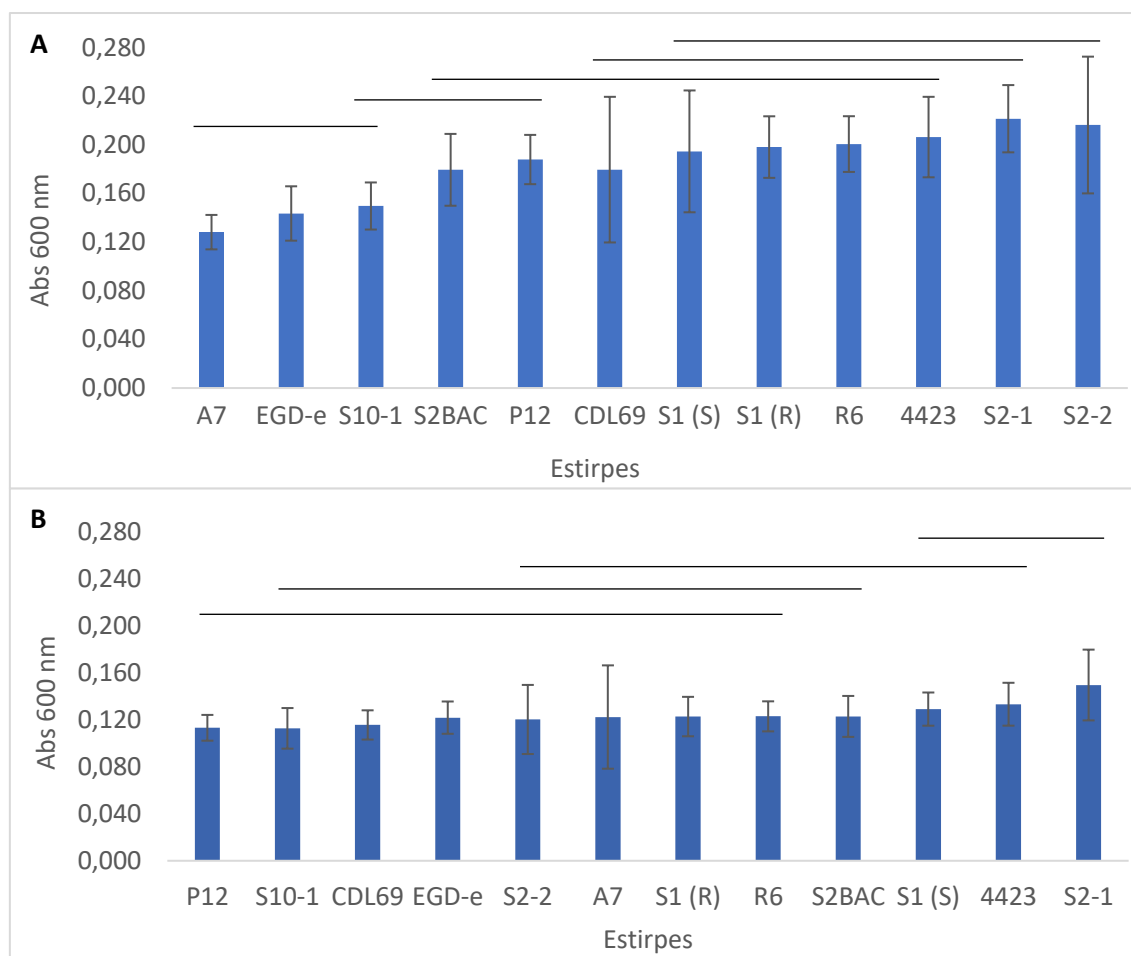


Figura 8. Avaliação da formação de biofilme pelo método do cristal violeta para 12 estirpes, incubadas em TSB-YE, durante 48 h a 25 °C (A) e durante 7 dias a 11 °C (B). As barras de erro representam o desvio padrão. As linhas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores médios.

A análise dos dados obtidos a 25 °C (Fig. 8A) permitiu identificar cinco grupos de estirpes que apresentam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Na formação do biofilme a 11 °C (Fig. 8B), quatro grupos de estirpes exibem diferenças significativas ($p < 0,05$), o que poderá indicar que os biofilmes produzidos a baixas temperaturas são mais homogêneos (mais estirpes formam biofilme de modo semelhante).

A partir da Figura 8 é possível observar três estirpes (A7, EGD-e e S10-1) menos produtoras de biofilme a 25 °C, que também fazem parte do grupo das menos produtoras a 11 °C. O mesmo é observado quando se analisa os grupos das maiores produtoras. As estirpes S1(S), 4423 e S2-1 fazem parte do grupo das mais produtoras de biofilme a 11 °C e também pertencem ao mesmo grupo quando cresceram a 25 °C.

Para uma melhor interpretação da influência da temperatura na formação do biofilme, foram comparados os valores de absorvância obtidos da formação de biofilme a 25 °C e quando o biofilme foi produzido a 11 °C (Fig. 9).

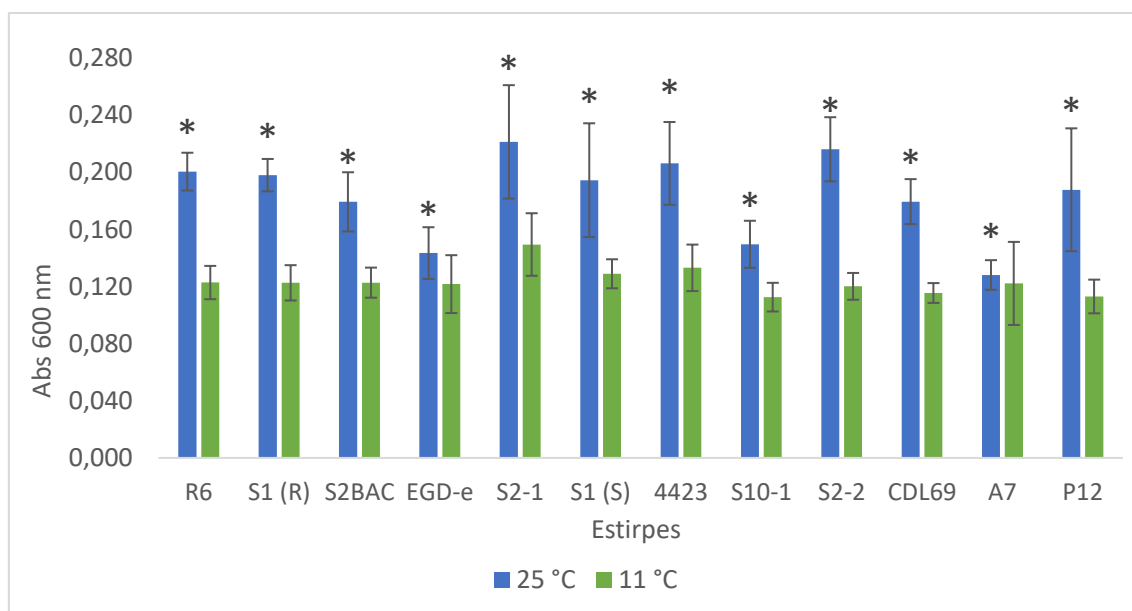


Figura 9. Comparação, entre condições de incubação na avaliação da formação de biofilme pelo método do cristal violeta, para 12 estirpes. Incubação durante 7 dias a 11 °C (■) e 48 h a 25 °C (■). (*) Diferenças significativas entre estirpes ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados, todas as estirpes apresentaram diferenças significativas entre condições de formação de biofilme. Para todas as estirpes, o valor de absorvância a 25 °C foi sempre mais elevado do que a 11 °C, o que quer dizer que as estirpes foram mais produtoras de biofilme quando incubadas a 25 °C. O mesmo também foi observado por Kadam *et al.* (2013), Nilsson *et al.* (2011) e Pan *et al.* (2006). Kadam *et al.* (2013), usando este método, mostraram que a temperatura de incubação tem um papel fundamental na formação de biofilme. Estes autores confirmaram que a formação de biofilme diminui significativamente com a diminuição da temperatura de incubação.

3.2.2. Enumeração celular

O método de avaliação da formação de biofilme por enumeração celular, ao contrário do método do cristal violeta, pode ser utilizado para a determinação do número de células viáveis. Neste método, o biofilme é formado em *coupons* de aço inoxidável, uma vez que é o material mais frequentemente utilizado na indústria alimentar (Hood & Zottola, 1997).

Avaliação da formação de biofilme a 25 °C

Para melhor simular as condições existentes na indústria alimentar, a capacidade de formação de biofilme foi então avaliada através da incubação das estirpes, em *coupons* de aço inoxidável, a 25 °C, durante 48 horas. Para o crescimento dos biofilmes, utilizou-se meio TSB-YE e TSB-YE/10 para simular condições de limpeza pouco eficaz e de limpeza eficaz, respectivamente. A capacidade de formação de biofilme foi avaliada pelo logaritmo do número de células viáveis por cm² (Log UFC/cm²).

A formação de biofilme em meio rico (TSB-YE) variou entre 5,77 e 6,67 Logs (Fig. 10A). Em meio diluído (TSB-YE/10), a variação da formação de biofilme foi entre 5,59 e 6,62. Em TSB-YE/10, a estirpe EGD-e apresentou-se a como menos produtora das 12 estirpes testadas (Fig. 10B).

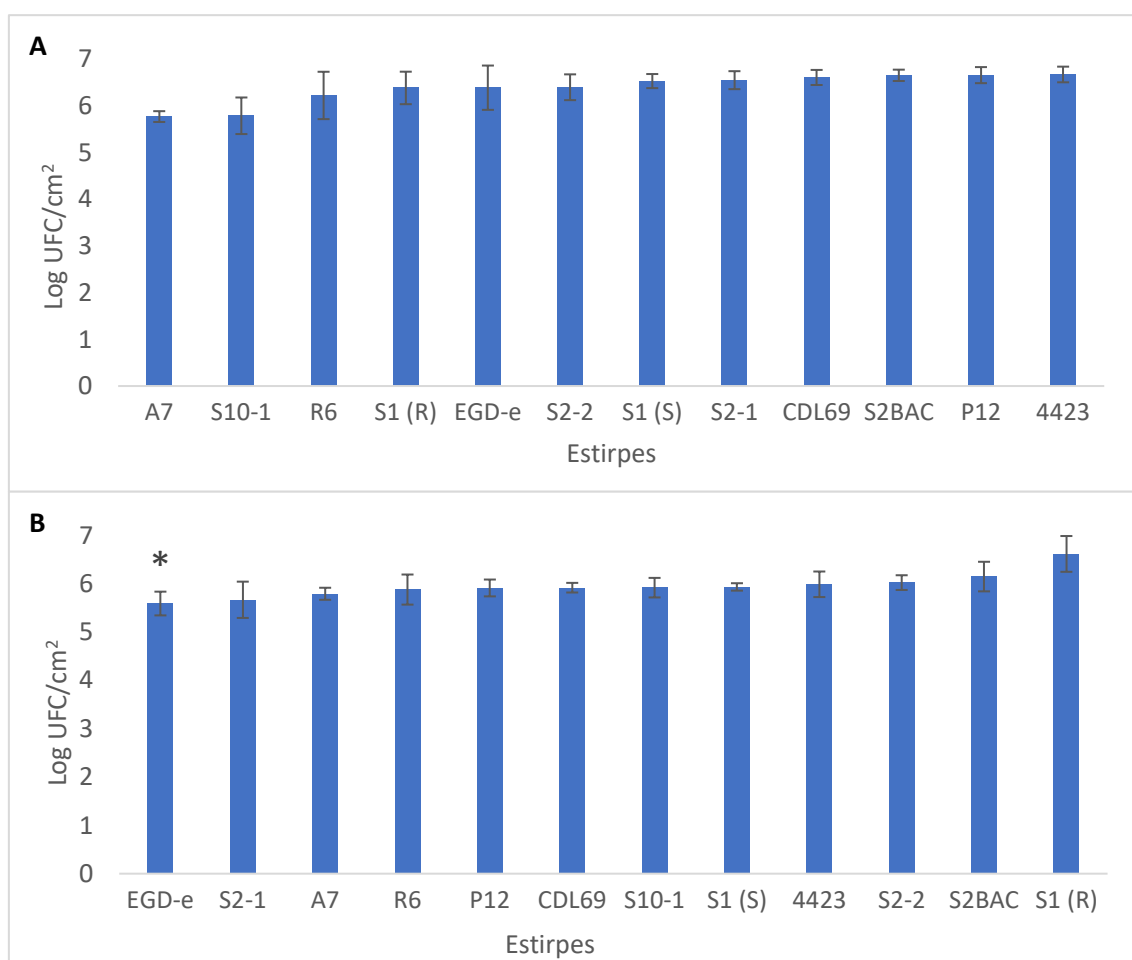


Figura 10. Avaliação da formação de biofilme por enumeração celular para 12 estirpes, incubadas em meio TSB-YE (A) e TSB-YE/10 (B), durante 48 h a 25 °C. (*) Diferenças significativas ($p < 0,05$).

Ao contrário do que aconteceu em meio diluído, as estirpes incubadas em meio rico não apresentaram diferenças significativas entre si (Fig. 10A). À semelhança do que aqui é observado, os resultados de Bonsaglia *et al.* (2014), em meio rico, também mostraram não existirem diferenças significativas na capacidade de produção de biofilme entre as estirpes, quando a temperatura de incubação foi de 20 °C, independentemente do tempo de incubação.

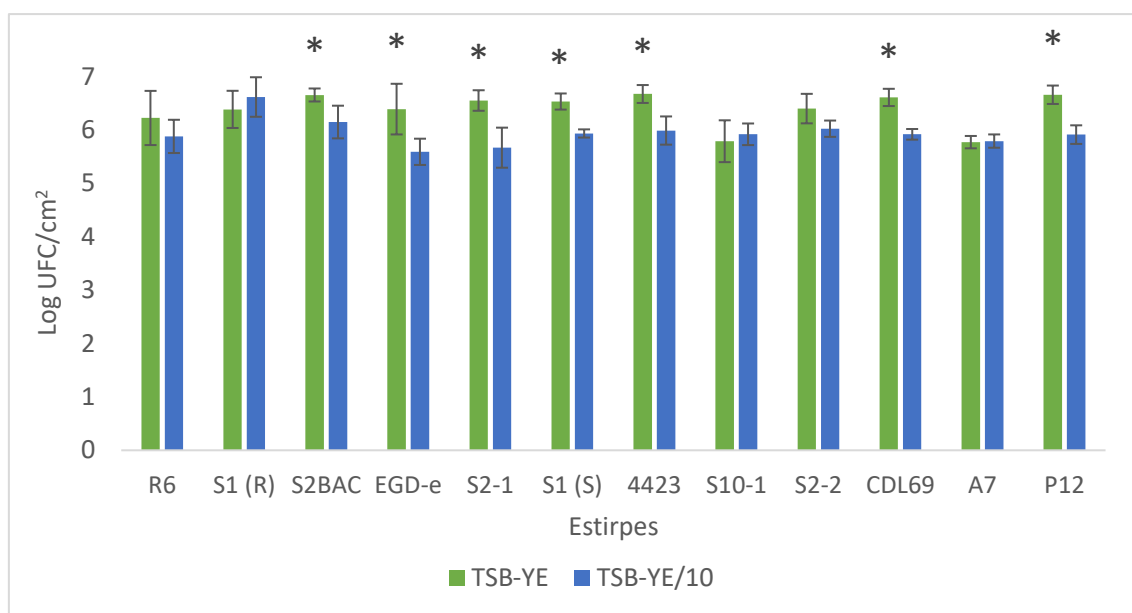


Figura 11. Comparação da formação de biofilme por enumeração celular, após 48 h de incubação a 25 °C em meio TSB-YE (■) e em meio TSB-YE/10 (■). (*) Diferenças significativas ($p < 0,05$).

A Figura 11 apresenta a comparação da capacidade de formação de biofilmes, nos dois meios de cultura. Sete das 12 estirpes estudadas (S2BAC, EGD-e, S2-1, S1(S), 4423, CDL69 e P12) apresentam maior produção de biofilme quando foram inoculadas em meio rico, durante 48 h a 25 °C. Harvey *et al.* (2007) estudaram a formação de biofilmes a 20 °C em meio rico (TSB-YE) e em meio diluído (1:15 TSB-YE), durante 24, 48 e 72 horas. Os autores concluíram que a produção de biofilme foi maior em meio TSB-YE comparado com a produção em meio diluído (1:15 TSB-YE). Poimenidou *et al.* (2016) e Stepanović *et al.* (2004) também estudaram a formação de biofilme em meio diluído (1:10 TSB-YE e 1:20 TSB-YE, respectivamente) e em meio rico (TSB-YE), e igualmente concluíram que o meio diluído era o menos eficaz na produção de biofilme. Os resultados destes autores estão assim de acordo com os resultados apresentados neste trabalho.

Avaliação da formação de biofilme a 11 °C

De modo a simular as condições existentes na indústria alimentar, onde a cadeia de frio está sempre presente, a capacidade de formação de biofilme das estirpes foi, também, avaliada através da incubação das estirpes a 11 °C, durante sete dias.

A formação de biofilme em meio rico (Figura 12A) variou entre 5,07 e 6,69 Logs, enquanto que em meio diluído (Fig. 12B) variou de 5,03 a 5,92 Logs.

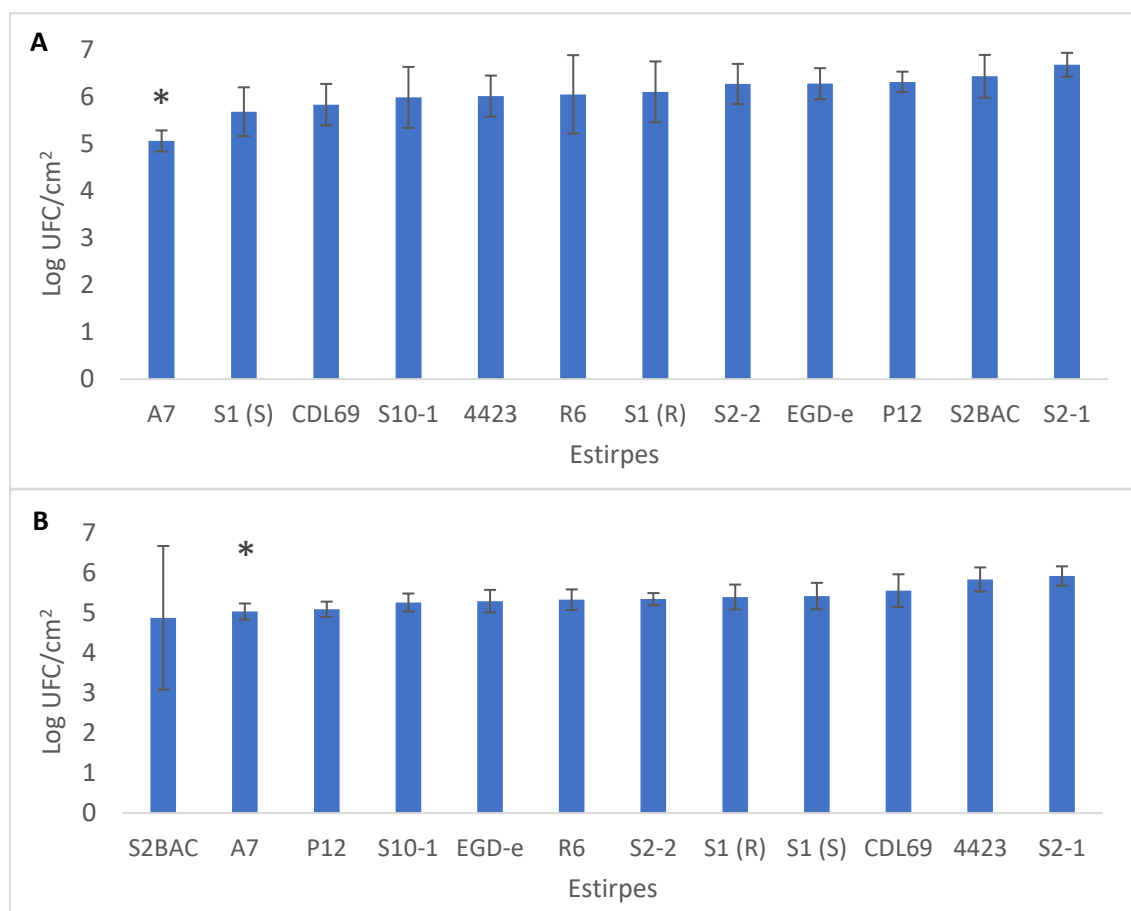


Figura 12. Avaliação da formação de biofilme por enumeração celular para 12 estirpes, incubadas em meio TSB-YE (A) e TSB-YE/10 (B), durante 7 dias a 11 °C.

A esta temperatura, a estirpe A7 mostrou ser significativamente menos produtora de biofilme que as outras 11 estirpes, em ambos os meios. Esta estirpe também pertenceu ao grupo das menores produtoras de biofilme pelo método do cristal violeta, a 11 °C (Fig. 8B).

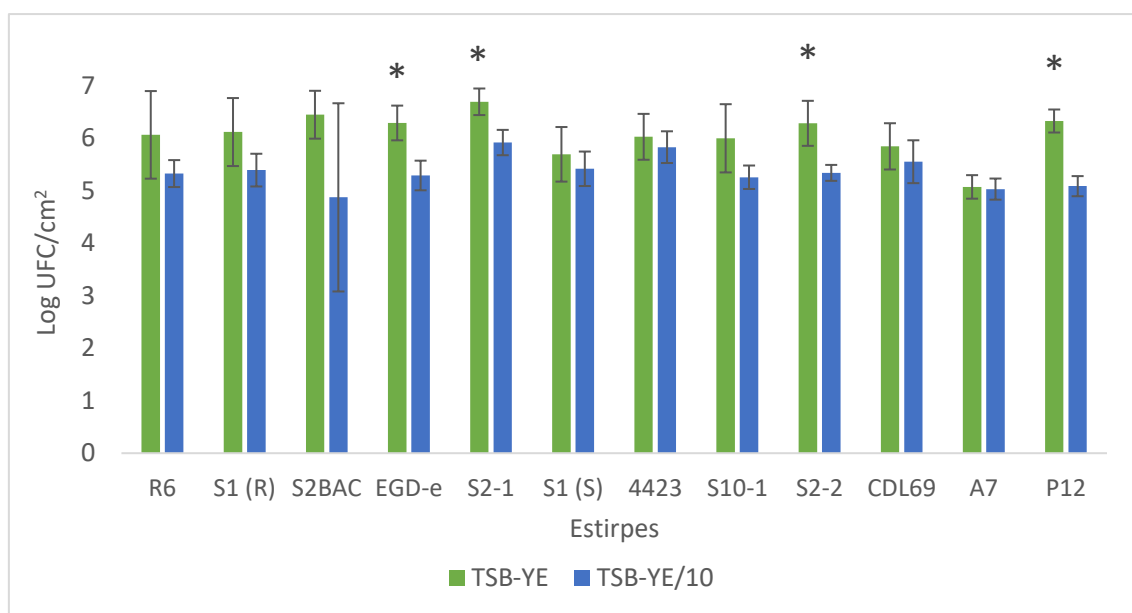


Figura 13. Comparação da formação de biofilme por enumeração celular, após 7 dias de incubação a 11 °C, em meio TSB-YE (■) e em meio TSB-YE/10 (■). (*) Diferenças significativas ($p < 0,05$).

Quando se compararam as estirpes em ambos os meios de cultura a esta temperatura baixa (Fig. 13), as estirpes EGD-e, S2-1, S2-2 e P12 apresentaram maior produção de biofilme quando incubadas em meio rico. Para as outras estirpes, não se verificaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os dois meios de incubação (Fig. 13).

Kadam *et al.* (2013), verificaram que incubações acima de 120 horas (cinco dias), a 12 °C, não aumentaram significativamente a formação de biofilme em meio rico. No entanto, em meio pobre em nutrientes, os níveis de formação de biofilme foram elevados e observaram um ligeiro aumento com mais tempo de incubação. Os autores concluíram, assim, que a produção de biofilme por *L. monocytogenes* é mais elevada em meio mínimo comparada com a produção em meio rico em nutrientes. Comparando com os resultados deste trabalho, o mesmo não se verificou. As quatro estirpes referidas apresentaram valores de produção de biofilme mais elevados quando incubadas em meio rico em nutrientes.

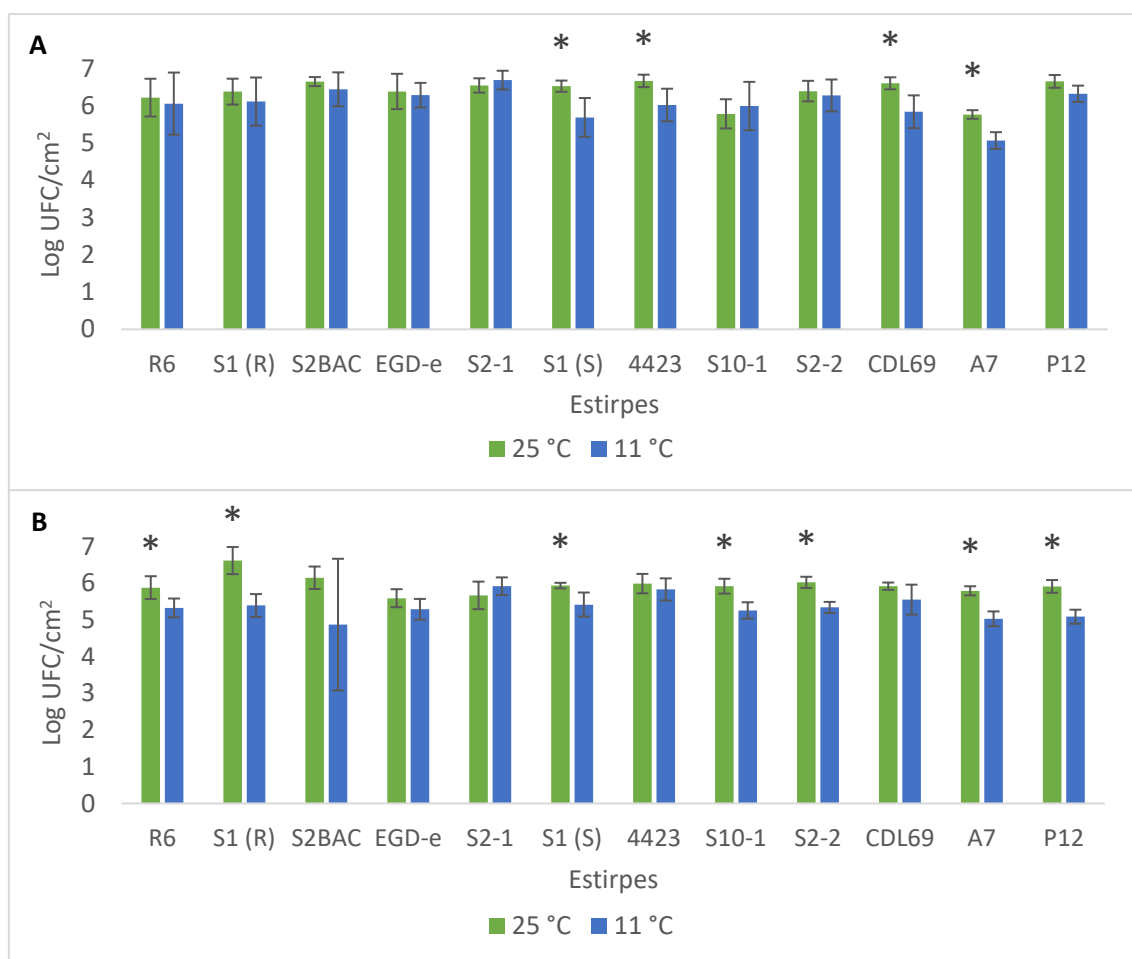


Figura 14. Comparação na avaliação da formação de biofilme por enumeração celular, após 48 h de incubação a 25 °C (■) e após 7 dias de incubação a 11 °C (■), em meio TSB-YE (A) e TSB-YE/10 (B). (*) Diferenças significativas ($p < 0,05$).

Na Figura 14 são comparadas as temperaturas de incubação, para cada meio de crescimento. Em meio rico (Fig. 14A), quatro estirpes (S1(S), 4423, CDL69 e A7) apresentaram significativamente maior produção de biofilme a 25 °C. No entanto, em meio diluído (Fig. 14B) sete das 12 estirpes (R6, S1(R), S1(S), S10-1, S2-2, A7 e P12) apresentaram maior produção de biofilme a 25 °C. Kadam *et al.* (2013) também mostraram que a formação de biofilme diminui com a diminuição da temperatura.

3.3. Avaliação da susceptibilidade ao P3 OXONIA

Para se avaliar a susceptibilidade dos biofilmes ao desinfetante P3 OXONIA, cada biofilme produzido às temperaturas de 25 °C e de 11 °C, respectivamente, foi testado a duas concentrações (0,5% [v/v] e 1% [v/v]) e dois tempos de exposição ao desinfetante (cinco minutos e sete minutos e meio).

3.3.1. Susceptibilidade de biofilmes produzidos a 25 °C

Em meio TSB-YE, cinco estirpes (R6, S2BAC, 4423, S2-2 e CDL69) não mostraram redução logarítmica para a concentração 0,5% (v/v) de P3 com cinco minutos de exposição. Ao aumentar-se o tempo de exposição para 7,5 minutos, todas as estirpes referidas anteriormente, à exceção da estirpe R6, sofreram uma redução superior a 4 Logs (Fig. 15A).

Quando os biofilmes foram expostos à concentração de 1% (v/v) durante cinco minutos (Fig. 15B), a estirpe S10-1 foi a única a não atingir os valores de redução. Com o aumento do tempo de exposição, a estirpe mostrou redução superior a quatro logaritmos.

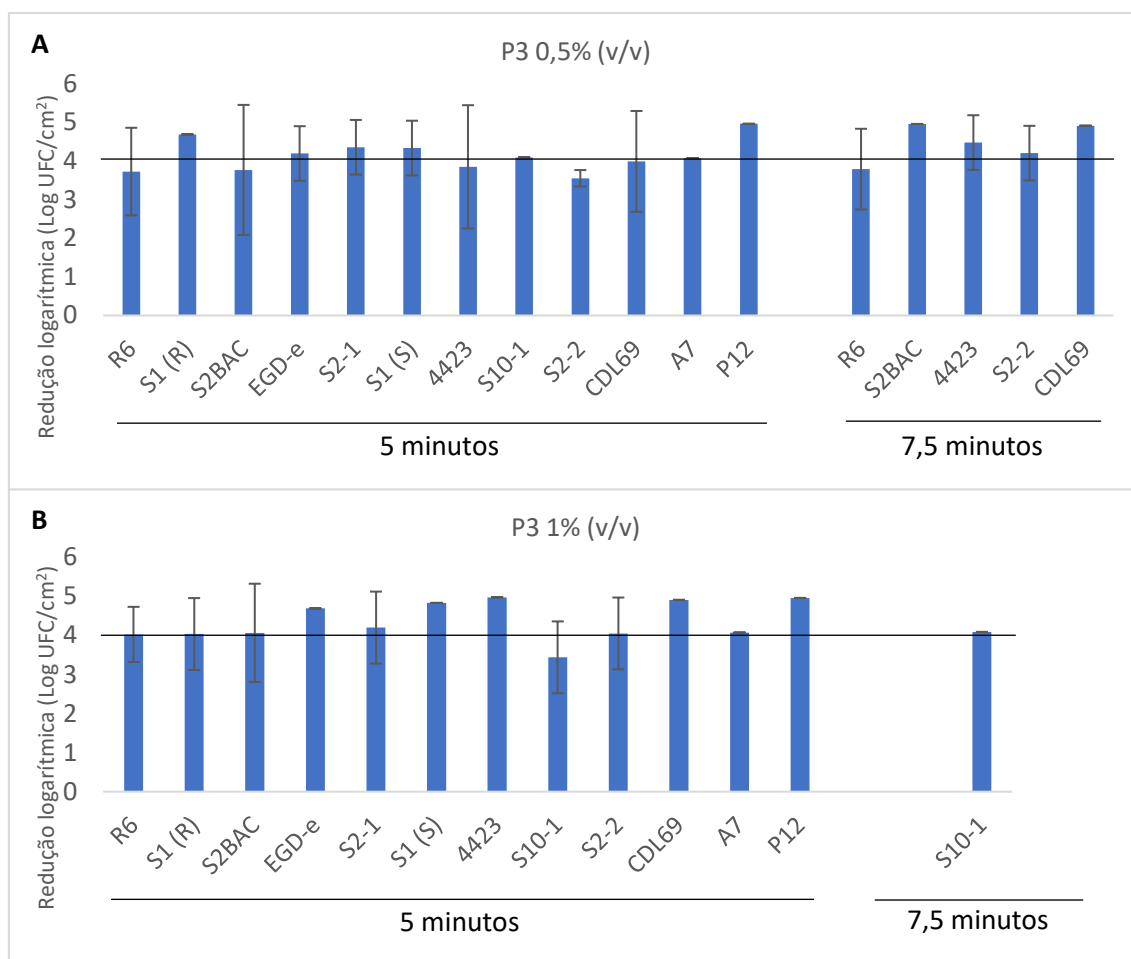


Figura 15. Tratamento de biofilmes, incubados em TSB-YE durante 48 h a 25 °C, com o desinfetante P3, com concentrações 0,5% [v/v] (A) e 1% [v/v] (B). O tratamento com o desinfetante é considerado efectivo quando se observa uma redução logarítmica superior a 4.

A Figura 16 apresenta os resultados para a exposição de biofilmes produzidos em meio diluído. Quando foi aplicado P3 com concentração 0,5% (v/v) (Fig. 16A) durante 5 minutos, mais de metade das estirpes (R6, S2BAC, EGD-e, S2-1, S1(S), S2-2, CDL69 e A7) não atingiram os valores de redução. Ao aumentar-se o tempo de exposição, este número diminuiu. No entanto, as estirpes R6, EGD-e, S2-1 e A7 continuaram a não mostrar redução logarítmica efectiva.

Ao aplicar-se 1% (v/v) de concentração com cinco minutos de exposição (Fig. 16B), não houve redução logarítmica efectiva em metade das estirpes (EGD-e, S2-1, S1(S), 4423, S10-1 e S2-2). Quando se aumentou o tempo de exposição para 7,5 minutos, as estirpes EGD-e, S2-1 e S1(S) continuaram a estar abaixo do nível de redução logarítmica efectiva.

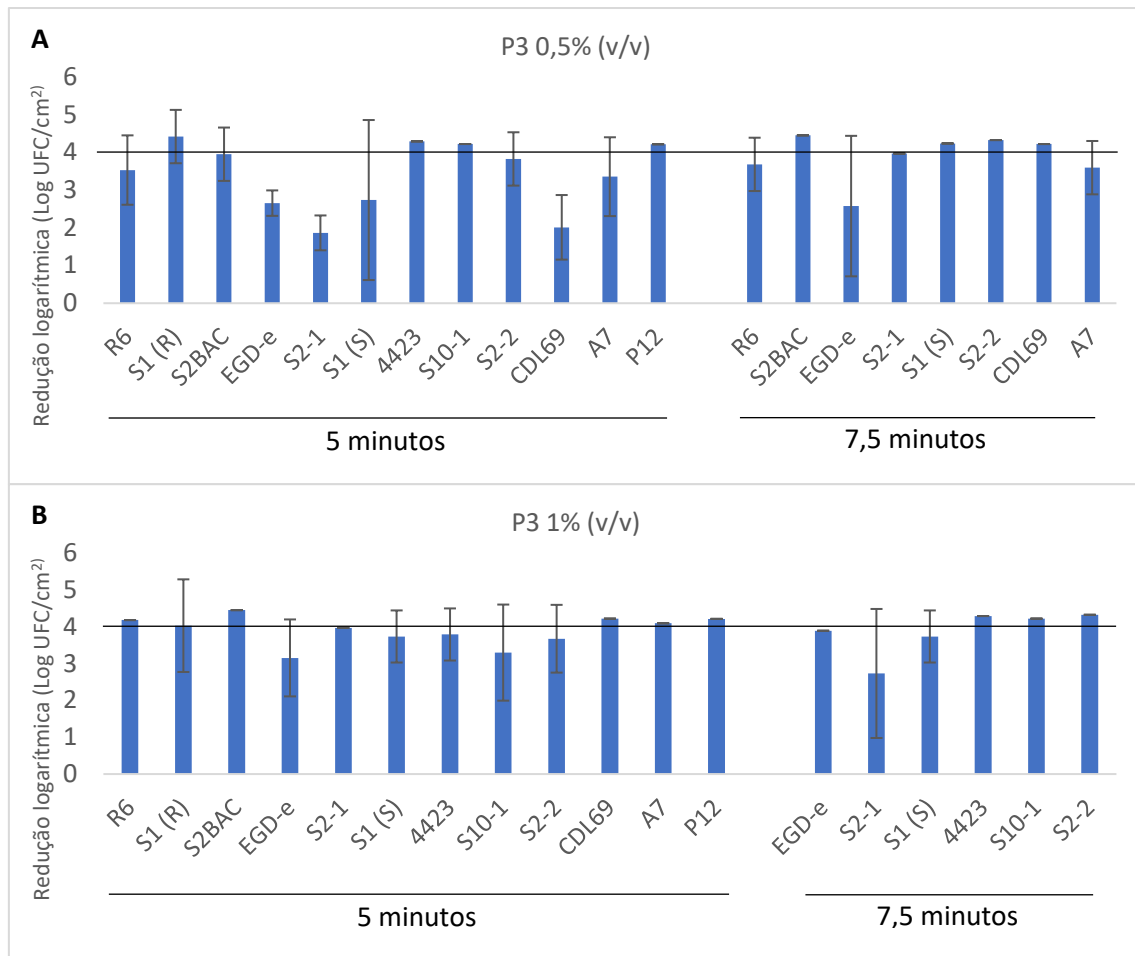


Figura 16. Tratamento de biofilmes, incubados em TSB-YE/10 durante 48 h a 25 °C, com o desinfetante P3, com concentrações 0,5% [v/v] (A) e 1% [v/v] (B).

O tratamento com o desinfetante é considerado efectivo quando se observa uma redução logarítmica superior a 4.

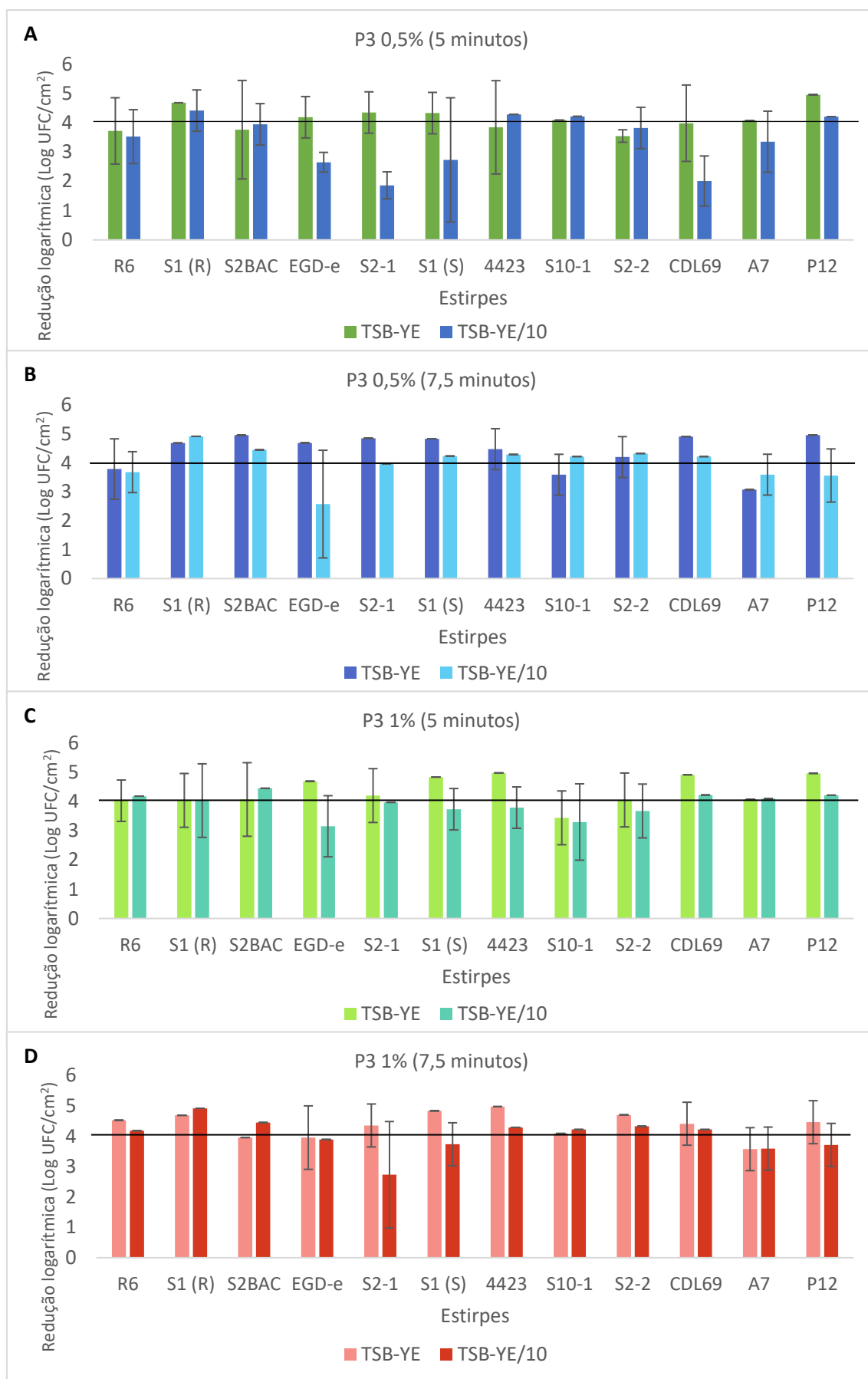


Figura 17. Comparação da susceptibilidade dos biofilmes ao P3, após incubação em TSB-YE e TSB-YE/10, durante 48 h a 25 °C. É indicada a redução logarítmica na contagem de células viáveis após o tratamento com P3 (0,5 e 1% [v/v]) para tempos de exposição de 5 min e 7,5 minutos. O tratamento com o desinfetante é considerado efectivo quando se observa uma redução logarítmica superior a 4.

A Figura 17 mostra que não existem diferenças significativas na susceptibilidade das estirpes ao P3, quando se compara o seu crescimento em meio rico e em meio diluído, para diferentes concentrações e tempos de exposição. O mesmo também foi verificado por Costa *et al.* (2016), ao analisarem o comportamento de estirpes persistentes e esporádicas de diversas origens.

Os resultados anteriores demonstraram que o desinfectante foi eficaz na inativação de algumas estirpes. Cruz & Fletcher (2012) estudaram a acção de diversos compostos activos presentes em diferentes desinfectantes, na inativação de biofilmes formados por *L. monocytogenes*. Os autores testaram os diferentes desinfectantes com tempo de exposição de cinco minutos. Os resultados sugeriram que os desinfectantes com base em cloreto de sódio acidificado, dióxido de cloro e mistura de peróxido de hidrogénio com ácido peracético atingiram redução de cinco logaritmos. No presente trabalho, foi evidenciada uma maior eficácia do desinfectante quando os biofilmes foram expostos durante sete minutos e meio, independentemente da concentração aplicada.

Analisando as Figura 15, 16 e 17 quanto à variação da concentração aplicada, em geral, foram observados melhores resultados com o dobro da concentração de P3. Porém, Królasik *et al.* (2010) aplicaram um desinfectante à base de peróxido de hidrogénio e ácido peracético durante dez minutos, e obtiveram melhores resultados para a concentração de 0,5% do que para 1%.

3.3.2. Susceptibilidade de biofilmes produzidos a 11 °C

Quando os biofilmes foram produzidos em meio rico, e foi aplicada a concentração 0,5% (v/v) de P3 (Fig. 18A) durante cinco, apenas três estirpes (R6, S2-1 e P12) obtiveram redução logarítmica. Ao aumentar-se o tempo de exposição, apenas as estirpes S2BAC, EGD-e e S10-1 apresentaram redução logarítmica.

Ao se aplicar a concentração de 1% (v/v) (Fig. 18B) durante cinco minutos, apenas a estirpe 4423 mostrou redução logarítmica aceitável. Quando se aumentou o tempo de exposição, as estirpes S1(S), A7 e P12 foram as únicas que não atingiram a redução de quatro logaritmos.

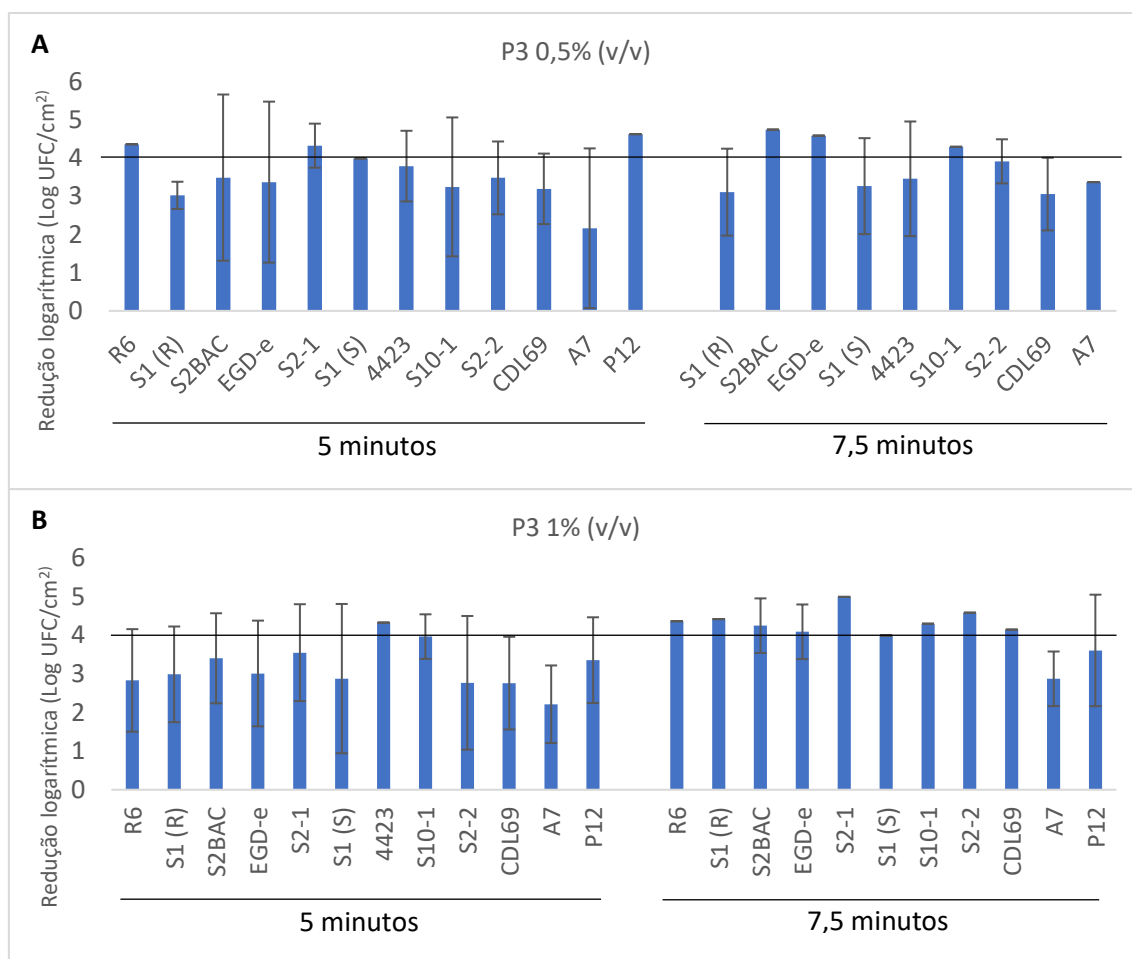


Figura 18. Tratamento de biofilmes, incubados em TSB-YE durante 7 dias a 11 °C, com o desinfetante P3, com concentrações 0,5% [v/v] (A) e 1% [v/v] (B). O tratamento com o desinfetante é considerado efectivo quando se observa uma redução logarítmica superior a 4.

Em meio diluído, quando se usou P3 a 0,5% (v/v) (Fig. 19A) durante cinco minutos, apenas a estirpe 4423 atingiu a redução de quatro logaritmos. Após o aumento do tempo de exposição, nenhuma estirpe mostrou redução logarítmica efectiva.

A concentração de P3 foi então aumentada para 1% (v/v) (Fig. 19B) com cinco minutos de exposição, somente a estirpe S2-1 atingiu a redução 4 Logs. Ao aumentar-se o tempo de exposição, apenas a estirpe 4423 atingiu a redução logarítmica aceitável. Apenas duas das 12 estirpes (S2-1 e 4423) mostraram redução efectiva nas condições testadas (Fig. 19).

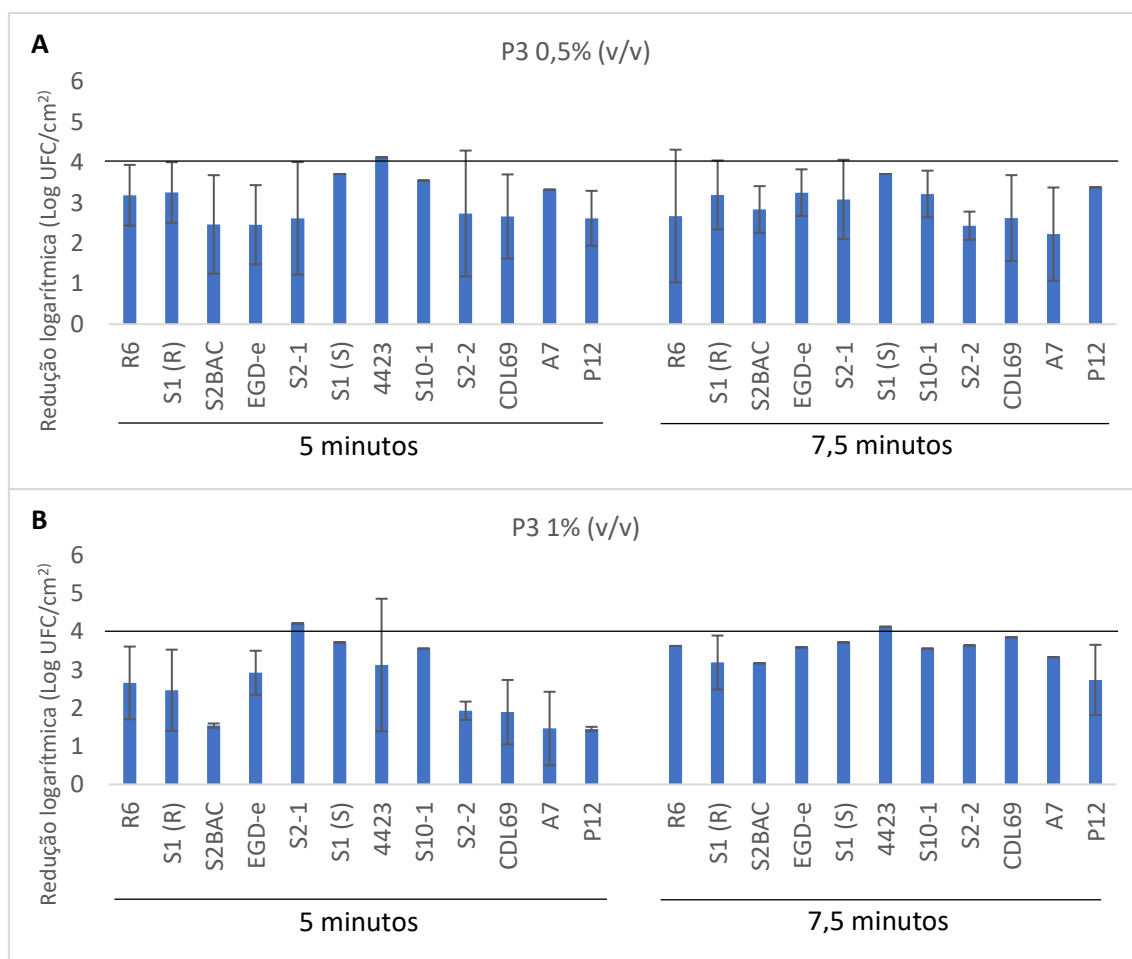


Figura 19. Tratamento de biofilmes, incubados em TSB-YE/10, durante 7 dias a 11 °C, com o desinfetante P3, com concentrações 0,5% [v/v] (A) e 1% [v/v] (B).

O tratamento com o desinfetante é considerado efectivo quando se observa uma redução logarítmica superior a 4.

Ao contrário do que aconteceu na susceptibilidade dos biofilmes produzidos a 25 °C (Fig. 17), a susceptibilidade dos biofilmes produzidos a 11 °C apresentou diferenças significativas entre condições (Fig. 20).

Quando o P3 foi aplicado na concentração de 0,5% (v/v) durante cinco minutos (Fig. 20A), as estirpes S1(S) e P12 apresentaram diferenças significativas, quando se comparou o crescimento em TSB-YE e em TSB-YE/10. No entanto, a estirpe S1(S), incubada quer em meio rico quer em meio diluído, não mostrou redução logarítmica efectiva. A estirpe P12 mostrou ser mais susceptível em meio rico do que em meio diluído, apresentando, no primeiro, redução logarítmica superior a quatro logaritmos.

Para a mesma concentração de P3, ao aumentar-se o tempo de exposição (Fig. 20B), as diferenças significativas aumentaram em relação ao observado na Figura 20A. Cinco (S2BAC, EGD-e, S10-1, S2-2 e A7) das 12 estirpes apresentaram diferenças significativas. As estirpes

S2BAC, EGD-e e S10-1, apresentaram redução logarítmica efectiva em meio rico. No entanto, as estirpes S2-2 e A7 não mostraram redução logarítmica nas duas condições (TSB-YE e TSB-YE/10).

Quando a concentração de P3 aumentou e o tempo de exposição foi de cinco minutos (Fig. 20C), apenas duas estirpes (4423 e P12) apresentaram diferenças significativas. No entanto, a estirpe 4423 apresentou redução logarítmica efectiva quando foi incubada em TSB-YE.

Com o aumento do tempo de exposição, mantendo-se a mesma concentração de P3 (Fig. 20D), as estirpes não apresentaram diferenças significativas quando se comparam as condições de crescimento (TSB-YE e TSB-YE/10).

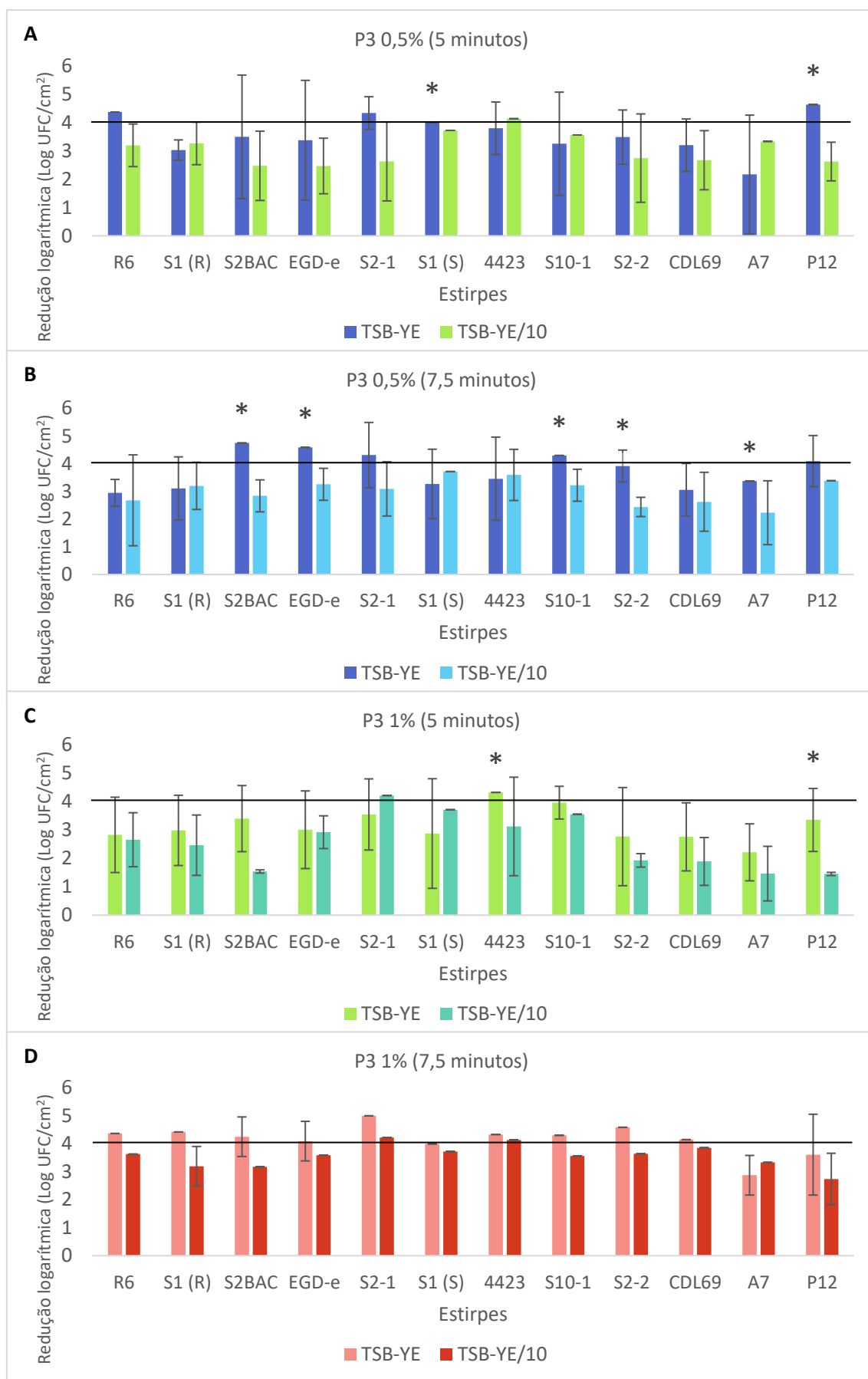


Figura 20. Comparação da susceptibilidade dos biofilmes ao P3 OXONIA, após incubações em TSB-YE e TSB-YE/10, durante 7 dias a 11 °C. É indicada a redução logarítmica na contagem de células viáveis após o tratamento com P3 (0,5 e 1% [v/v]) para tempos de exposição de 5 minutos e 7,5 minutos. O tratamento com o desinfetante é considerado efectivo quando é observada uma redução logarítmica superior a 4. (*) Diferenças significativas ($p < 0,05$).

Como já foi referido, os biofilmes microbianos representam um problema potencial na indústria alimentar, especialmente se se tratar de bactérias patogénicas aderidas a equipamentos do processamento alimentar (Moltz & Martin, 2005). *L. monocytogenes* consegue aderir a aço inoxidável e tem a capacidade de desenvolver uma matriz extracelular, frequentemente associada à formação de biofilme (Helke, Somers, & Wong, 1993).

Estudos anteriores, demonstraram que os biofilmes bacterianos exibem resistência quando expostos a vários stresses físico-químicos, como por exemplo agentes antimicrobianos (Berrang, Frank, & Meinersmann, 2008; Pan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009).

A acção de desinfectantes à base de peróxido de hidrogénio e ácido peracético, em biofilmes de *L. monocytogenes*, tem sido estudada (Belessi *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2016; Cruz & Fletcher, 2012; Królasik *et al.*, 2010; Poimenidou *et al.*, 2016). Knowles & Roller (2001) declararam que estas substâncias activas têm capacidade de remover biofilmes de aço inoxidável. Em geral, as estirpes estudadas apresentaram baixa susceptibilidade ao desinfectante. A baixa susceptibilidade pode dever-se à quantidade de PEC presente na matriz, como foi referido por Sutherland (2001). Este autor afirmou que existe uma maior dificuldade de erradicação de biofilmes que contenham elevada quantidade de PECs. Esta dificuldade na limpeza e desinfecção é devida ao efeito protector da matriz extracelular. A baixa susceptibilidade das células no biofilme pode ser explicada pela difusão mais lenta do desinfectante através da matriz do biofilme, tornando mais difícil alcançar as camadas mais profundas (Królasik *et al.*, 2010).

Em 2010, Królasik *et al.* testaram um desinfectante contendo uma mistura de peróxido de hidrogénio e ácido peracético. Foram aplicadas concentrações de 0,2% e 0,5% durante 10 minutos de exposição. Os resultados mostraram que os tratamentos não foram efectivos, apenas se atingindo reduções entre um e dois logaritmos. Estes autores obtiveram resultados satisfatórios quando aplicaram 1% de produto durante 30 minutos, ocorrendo reduções de cinco logaritmos. Neste trabalho, para a concentração 1% e com mais tempo de exposição (7,5 minutos), no geral, houve uma inactivação mais eficiente. Estes resultados vão ao encontro do trabalho de Królasik *et al.* (2010).

A temperatura de incubação dos biofilmes demonstrou ser um factor condicionante para a susceptibilidade a desinfectantes. Belessi *et al.* (2011) testaram a acção de um desinfectante (ácido peracético como composto activo), com concentração de 2% em biofilmes incubados a 5 °C e a 20 °C. Os autores concluíram que os biofilmes formados a 20 °C foram menos susceptíveis ao desinfectante que os biofilmes formados a 5 °C. Em 2011, Lourenço *et al.* produziram biofilmes às temperaturas de 37 °C e de 12 °C e testaram a susceptibilidade a quatro

desinfetantes comerciais. Os resultados destes autores, com biofilmes com número de UFCs equivalentes, mostraram menor susceptibilidade quando os biofilmes foram produzidos a 12 °C. No trabalho aqui apresentado, as estirpes, quando apresentaram diferenças significativas, exibiram sempre maior produção de biofilmes a 25 °C, o que pode justificar a menor susceptibilidade a 11 °C.

4. Conclusões e perspectivas futuras

O estudo de patógenos alimentares que apresentam capacidade de formação de biofilmes, como *L. monocytogenes*, tem sido importante para a segurança alimentar e para a saúde dos consumidores. Na indústria alimentar, falhas nos procedimentos de higienização proporcionam a aderência, e consequentemente, a formação de biofilmes em equipamentos e superfícies, levando assim à contaminação e/ou recontaminação dos produtos alimentares.

As metodologias aplicadas neste trabalho permitiram a avaliação da capacidade de formação de biofilmes de 12 estirpes (nove persistentes e três controlos) de *L. monocytogenes*. O método de coloração pelo cristal violeta permite fazer uma avaliação indirecta dos biofilmes formados, pois são coradas também células não viáveis. Por sua vez, o método de enumeração celular em *coupons* de aço inoxidável permite uma avaliação das células viáveis do biofilme.

A estirpe persistente S2-1 e a estirpe controlo 4423 foram as estirpes que se destacaram por pertencerem ao grupo das melhores formadoras de biofilmes, para as duas temperaturas de incubação (25 °C e 11 °C) e com os dois métodos utilizados. Pelo contrário, a estirpe persistente A7 destacou-se por pertencer ao grupo das piores formadoras de biofilmes, também pelos dois métodos utilizados, e às duas temperaturas.

Com o método do cristal violeta, verificou-se que a temperatura de incubação teve efeito na quantidade de biofilme produzido. De facto, os resultados indicaram valores de absorvância mais elevados, quando as estirpes foram incubadas a 25 °C. A partir do método de enumeração celular, avaliou-se a formação de biofilmes em duas condições de meio de incubação, que pretenderam simular uma limpeza eficiente (TSB-YE/10) e uma limpeza muito pouco eficiente (TSB-YE). A maior disponibilidade de nutrientes (TSB-YE) mostrou ter efeito positivo na produção de biofilmes. A temperatura de 25 °C demonstrou ser a mais favorável para a produção de biofilmes, tendo-se obtido melhores resultados em meio rico TSB-YE.

A susceptibilidade das 12 estirpes ao P3 OXONIA mostrou diferenças no número de estirpes que atingiram os 4 Logs de redução para as duas temperaturas, particularmente se forem comparados os dois meios de incubação. Todas as estirpes incubadas em TSB-YE, a 25 °C, foram inactivadas com 1% (v/v) de P3 durante 7,5 minutos. No entanto, em meio TSB-YE/10, três estirpes (EGD-e, S1(S) e S2-1) sofreram reduções inferiores a 4 Logs. A estirpe persistente S2-1 foi isolada de empresas de enchidos de carne de porco e foi a estirpe que apresentou valores mais elevados de produção de biofilme, através do método do cristal violeta. À temperatura de incubação de 11 °C, em meio TSB-YE, três (S1(S), A7 e P12) das 12 das estirpes, não foram efectivamente eliminadas pelo P3. Em meio TSB-YE/10, apenas as estirpes S2-1 e 4423 atingiram

os 4 Logs de redução. Em incubações a 11 °C, as estirpes S1(S) e A7, isoladas de empresas de enchidos de carne de porco e de matadouros de empresas de carne de frango, respectivamente, destacaram-se por nunca terem sido inactivadas pelo desinfectante, em qualquer um dos cenários testados.

No geral, as estirpes apresentaram uma menor susceptibilidade quando foram incubadas em meio diluído, a 11 °C. Contudo, parece não existir relação entre a susceptibilidade ao P3 e a capacidade de produção de biofilme das estirpes. Um exemplo é a estirpe A7 que apresentou ser muito pouco susceptível ao P3 e foi sempre a que exibiu menor capacidade de produção de biofilme.

No futuro, de modo a continuar a avaliação destas estirpes, devem ser realizados mais ensaios para testar a susceptibilidade a outros desinfectantes com outros compostos activos.

5. Bibliografia

- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., & Rørvik, L. M. (2000). Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 57–63.
- Abee, T., Kovács, Á. T., Kuipers, O. P., & van der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 172–179.
- Asselt, A. J., & Giffel, M. C. (2005). Pathogen resistance to sanitizers. In H. L. M. Lelieveld, J. Holah, & M. A. Mostert (Eds.), *Handbook of hygiene control in the food industry* (1st ed., p. 745). Woodhead Publishing.
- Aurora, R., Prakash, A., & Prakash, S. (2009). Genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from milk and ready-to-eat indigenous milk products. *Food Control*, 20(9), 835–839.
- Belessi, C. E. A., Gounadaki, A. S., Psomas, A. N., & Skandamis, P. N. (2011). Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145, S46–S52.
- Berrang, M. E., Frank, J. F., & Meinersmann, R. J. (2008). Effect of chemical sanitizers with and without ultrasonication on *Listeria monocytogenes* as a biofilm within polyvinyl chloride drain pipes. *Journal of Food Protection*, 71(1), 66–69.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C., & Meile, L. (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 526–532.
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J. P., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35(1), 386–391.
- Borucki, M. K., & Call, D. R. (2003). *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5537–5540.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336–7342.
- Caixeta, D. S., Scarpa, T. H., Brugnera, D. F., Freire, D. O., Alves, E., Abreu, L. R. De, & Piccoli, R.

H. (2012). Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(1), 142–150.

Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8.

Chambel, L., Sol, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Zilhão, I., Barata, B., Jordan, S., Perni, S., Shama, G., Adrião, A., Faleiro, L., Requena, T., Peláez, C., Andrew, P. W. & Tenreiro, R. (2007). Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 52–63.

Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2007). Inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms using chemical sanitizers and heat. *Biofilms in the Food Environment*, 73–104.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996–1006.

Cloete, T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51(4), 277–282.

Costa, A., Bertolotti, L., Brito, L., & Civera, T. (2016). Biofilm formation and disinfectant susceptibility of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates from Gorgonzola cheese processing plants. *Foodborne Pathogens and Disease*, XX(XX), fpd.2016.2154.

Cruz, C. D., & Fletcher, G. C. (2012). Assessing manufacturers' recommended concentrations of commercial sanitizers on inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 26(1), 194–199.

da Silva, E. P., & De Martinis, E. C. P. (2013). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 957–968.

de Carvalho, C. C. C. R. (2007). Biofilms: recent developments on an old battle. *Recent Patents on Biotechnology*, 1(1), 49–57.

de Castro, V., Escudero, J. M., Rodriguez, J. L., Muniozguren, N., Uribarri, J., Saez, D., & Vazquez, J. (2012). Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Bizkaia, Spain, August 2012. *Eurosurveillance*, 17(42), 3–5.

de las Heras, A., Cain, R. J., Bielecka, M. K., & Vázquez-Boland, J. A. (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*, 14(2), 118–127.

de Oliveira, M. M. M., Brugnara, D. F., Alves, E., & Piccoli, R. H. (2010). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 97–106.

den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., Stasiewicz, M. J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L. K., Fortes, E., Nightingale, K. K., Kephart, D. & Wiedmann, M. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 6), 1882–1889.

DGS – Direcção-Geral da Saúde. Notificação electrónica de Doenças Transmissíveis de Declaração Obrigatória. Disponível em: <https://www.dgs.pt/em-destaque/notificacao-eletronica-de-doencas-transmissiveis-de-declaracao-obrigatoria-sinave.aspx>. Acesso em: 5 de Setembro de 2016.

Djordjevic, D., Wiedmann, M., & McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2950–2958.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004a). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819–3822.

Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P. & Buchrieser, C. (2004b). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Society*, 72(2), 1072–1083.

EFSA. (2014). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 - European Food Safety Authority - European Centre for Disease Prevention and Control. *EFSA Journal*, 13(12), 4329.

EN 13697 (2001) – Chemical disinfectants and antiseptics – Qualitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas–test method and requirements without mechanical action.

Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150–70.

Frank, J. F., & Koffi, R. A. (1990). Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 53(7), 550–554.

Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1–15.

Garrido, V., Vitas, A. I., & García-Jalón, I. (2010). The problem of Listeriosis and ready-to-eat products: prevalence and persistence. *Applied Microbiology*, 1182–1189.

Gibson, H., Taylor, J. H. H., Hall, K. E. E., & Holah, J. T. T. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87(1995), 41–48.

Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., Den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Swaminathan, B. & Sauters, B. D. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(6), 1280–1288.

Hain, T., Steinweg, C., & Chakraborty, T. (2006). Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *Journal of Biotechnology*, 126(1), 37–51.

Halter, E. L., Neuhaus, K., & Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2), 641–647.

Hamdi, T. M., Naïm, M., Martin, P., & Jacquet, C. (2007). Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 190–193.

Harvey, J., Keenan, K. P., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380–392.

Heir, E., Lindstedt, B. A., Røtterud, O. J., Vardund, T., Kapperud, G., & Nesbakken, T. (2004). Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *International Journal of Food Microbiology*, 96(1), 85–96.

Helke, D. M., Somers, E. B., & Wong, A. C. L. (1993). Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and buna-n in the presence of milk and individual milk components. *Journal of Food Protection*, 56(6), 479–484.

Holah, J. T., Bird, J., & Hall, K. E. (2004). The microbial ecology of high-risk, chilled food factories; evidence for persistent *Listeria* spp. and *Escherichia coli* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 68–77.

Holah, J. T., Taylor, J. H., Dawson, D. J., & Hall, K. E. (2002). Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, 92(31), 111S–120S.

Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1997). Adherence to stainless steel by food borne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2–3), 145–153.

Jeong, D. K., & Frank, J. F. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with micro-organisms isolated from meat and dairy processing environments. *Journal of Food Protection*, 57(7), 576–86.

Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 259–264.

Knowles, J., & Roller, S. (2001). Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide – based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 64(10), 1542–1548.

Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G. J., & Giaouris, E. (2012). Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2586–2595.

Królasik, J., Zakowska, Z., Krępska, M., & Klimek, L. (2010). Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. *Polish Journal of Microbiology*, 59(4), 281–287.

Kumar, C. G., & Anand, S. . (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2), 9–27.

- Larsen, M. H., Dalmasso, M., Ingmer, H., Langsrud, S., Malakauskas, M., Mader, A., Møretrø, T., Smole Možina, S., Rychli, K., Wagner, M., John Wallace, R., Zentek, J. & Jordan, K. (2014). Persistence of foodborne pathogens and their control in primary and secondary food production chains. *Food Control*, 44, 92–109.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M. & Allerberger, F. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9), 2210–2214.
- Leite, P., Rodrigues, R., Ferreira, M., Ribeiro, G., Jacquet, C., Martin, P., & Brito, L. (2006). Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 111–121.
- Liu, D., Lawrence, M. L., Ainsworth, A. J., & Austin, F. W. (2007). Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *International Journal of Food Microbiology*, 118(2), 101–115.
- López, V., Navas, J., & Martínez-Suárez, J. V. (2013). Low potential virulence associated with mutations in the *inlA* and *prfA* genes in *Listeria monocytogenes* isolated from raw retail poultry meat. *Journal of Food Protection*, 76(1), 129–32.
- López, V., Ortiz, S., Corujo, A., López, P., Navas, J., Moreno, R., & Martínez-Suárez, J. V. (2007). Traceback identification of an ingredient (pork dewlap) as the possible source of *Listeria monocytogenes* serotype 4b contamination in raw chicken products. *Journal of Food Protection*, 70(6), 1513–1517.
- López, V., Ortiz, S., Corujo, A., López, P., Poza, D., Navas, J., Moreno, R. & Martínez-Suárez, J. V. (2008). Different contamination patterns of lineage I and II strains of *Listeria monocytogenes* in a Spanish broiler abattoir. *Poultry Science*, 87(9), 1874–1882.
- Lourenço, A., Machado, H., & Brito, L. (2011). Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12 °C either in pure culture or in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed reduced susceptibility to sanitizers. *Journal of Food Science*, 76(2), 142–148.
- Lourenço, A., Rego, F., Brito, L., & Frank, J. F. (2012). Evaluation of methods to assess the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 75(8), 1411–1417.
- Mcdonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179.

McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 15–33.

Mereghetti, L., Quentin, R., Marquet-Van Der Mee, N., & Audurier, A. (2000). Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 5083–5086.

Moltz, A. G., & Martin, S. E. (2005). Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*, 68(1), 92–97.

Motarjemi, Y., Moy, G., & Todd, E. (2014). *Encyclopedia of Food Safety* (1st ed.). San Diego: Academic Press.

Nilsson, R. E., Ross, T., & Bowman, J. P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1), 14–24.

Orsi, R. H., Bakker, H. C. D., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(2), 79–96.

Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 1–15.

Ortiz, S., López, V., & Martínez-Suárez, J. V. (2014). The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 106–112.

Ortiz, S., López, V., Rodríguez, P., & Martínez-Suárez, J. V. (2016). The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: Evidence from comparative genome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1), 308–317.

Pan, Y., Breidt, F., & Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7711–7717.

Pérez-Trallero, E., Zigorraga, C., Artieda, J., Alkorta, M., & Marimón, J. M. (2014). Two outbreaks of *Listeria monocytogenes* infection, Northern Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 20(12),

2155–2157.

Pintado, C. M. B. S., Oliveira, A., Pampulha, M. E., & Ferreira, M. A. S. S. (2005). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology*, 22(1), 79–85.

Poimenidou, S. V., Chrysadaku, M., Tzakoniati, A., Bikouli, V. C., Nychas, G.-J., & Skandamis, P. N. (2016). Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 164–171.

Poulsen, L. V. (1999). Review: Article Microbial Biofilm in Food Processing. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 326, 321–326.

Pricope, L., Nicolau, A., Wagner, M., & Rychli, K. (2013). The effect of sublethal concentrations of benzalkonium chloride on invasiveness and intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 31(1), 230–235.

Rocourt, J., & Cossart, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (pp. 337–352). Washington, DC: American Society of Microbiology.

Rørvik, L. M., Caugant, D. A., & Yndestad, M. (1995). Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 25(1), 19–27.

Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 20(9), 407–413.

Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. Do. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585.

Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., & Švabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 428–432.

Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3–9.

Taylor, J. H., Rogers, S. J., & Holah, J. T. (1999). A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157 : H7 and *Pseudomonas*

aeruginosa at 10 and 20 degrees C. *Journal of Applied Microbiology*, 87(5), 718–725.

Vázquez-Boland, J. A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., & Goebel, W. (2001a). Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and Infection*, 3(7), 571–584.

Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domi, G., González-zorn, B., & Wehland, J. (2001b). *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 584–640.

Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., & den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), 286–292.

Wirtanen, G., & Salo, S. (2003). Disinfection in food processing-efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2(2–4), 293–306.

Xavier, J. B., Picioreanu, C., Almeida, J. S., & van Loosdrecht, M. C. M. (2003). Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, 76, 2–13.

Yang, H., Kendall, P. A., Medeiros, L. C., & Sofos, J. N. (2009). Efficacy of sanitizing agents against *Listeria monocytogenes* biofilms on high-density polyethylene cutting board surfaces. *Journal of Food Protection*, 72(5), 990–998.